

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB DE BLIDA



Faculté des Sciences Agronomiques-Vétérinaires et Biologiques.

Département de biologie.

Mémoire de Fin d'études En Vue de L'obtention du Diplôme de Master II En
SNV.

Option : Microbiologie.

THÈME :

**Contrôle de qualité microbiologique des 4 produits
pharmaceutiques non obligatoirement stérile « l'éosine aqueuse
bleu de méthylène, violet de gentiane, eau oxygénée »**

Présenté par :

IRKI ASMAA

Soutenu le : 30septembre2013

Devant le jury composée de :

-M^r GEDIOURA	MAITRE ASSISTANT A	(USDB) PRESIDENT
-M^{me} ASSANI	MAITRE ASSISTANTE A	(USDB) EXAMINATRICE
-M^r LARBI BOUKARA	MAITRE ASSISTANT A	(USDB) EXAMINATEUR
-Dr. MENOUERI M.N	MAITRE DE CONFERENCES A	(USDB) PROMOTEUR
-Dr KORSO M	MEDECIN SPECIALISTE	CO-PROMOTEUR

2012-2013

Remerciements

« Toute ma gratitude et tous mes remerciements :

Au Dr MENOUERI, maitre de conférences catégorie A, et qui est notre promoteur, qui a su être si attentif et si patient durant nos travaux.

A tous mes professeurs qui nous ont inculqué le savoir et la bonne marche à suivre pour atteindre notre objectif.

A Dr OULDROUIS et Dr KORSO responsables de laboratoire de contrôle de qualité.

A ceux qui nous ont soutenu de près ou de loin et qui on porté aide et assistance.

A tout ce panel, nous leurs disons du fond du cœur Merci. »

Dédicace :

« Ce modeste mémoire est destiné tout d'abord à mes parents et grand parents, mon mari, à mes frères et sœurs et mes amis, ainsi à tous ceux qui nous ont soutenu de près ou de loin tout au long de nos études. »

Asmaa

Résumé

Les préparations pharmaceutiques à usage externe ne sont pas obligatoirement stériles. Le contrôle microbiologique de ces préparations répond à des normes définies par la pharmacopée. Le but de notre étude est de faire un contrôle de qualité microbiologique des produits pharmaceutiques non obligatoirement stériles considérés à tort comme étant des antiseptiques : l'éosine aqueuse, bleu de méthylène, violet de gentiane et l'eau oxygénée, fabriqués et commercialisés en Algérie.

Au total sur 100 lots de produits pharmaceutiques non obligatoirement stériles « 32 flacons d'éosine aqueuse, 30 flacons de bleu de méthylène, 08 flacons de violet de gentiane et 30 flacons d'eau oxygénée » ont fait l'objet d'un contrôle microbiologique, 34 lots étaient non conformes (34%) représentés par : 28 lots d'éosine aqueuse (82.35%), 4 lots de bleu de méthylène (11.76) et 2 lots de violet de gentiane (5.89%).

Le contrôle visuel du sertissage et des étiquettes de différents flacons a permis de mettre en évidence la non-conformité de la majorité (95%) des échantillons observés dont 70% présentent l'inscription antiseptique, et 24% des bouchons non sertis, provenant de 19 producteurs différents.

L'absence de sertissage des flacons peut expliquer la contamination de ces produits pharmaceutiques.

Nous avons isolés et identifiés 26 souches de *Pseudomonas* « 24 souches des *Pseudomonas aeruginosa* et 2 souches de *Pseudomonas fluorescens* »

Mots clés : Éosine aqueuse, Bleu de méthylène, Violet de gentiane, Eau oxygénée, Contrôle de qualité microbiologique

ملخص:

التحضيرات الصيدلانية للاستعمال الخارجي ليست بضرورة معقمة، المراقبة الميكروبيولوجية لهذه التحضيرات تطابقه المقاييس المقررة من طرف الفارمكوبي.

الهدف من عملنا هو مراقبة هو مراقبة النوعية الميكروبيولوجية للمنتجات الصيدلانية ليست بضرورة معقمة، معروفة خطأ على أنها معقمة و هذا خطأ وهذه التحضيرات هي: إيوزيت المائي، أزرق الميثيلان، بنفسجي جنسيان، الماء الأوكسجيني من مجموع 100 عينة من المنتجات الصيدلانية التي ليست بالضرورة معقمة "32 قارورة من الإيوزين المائي، 30 قارورة من أزرق الميثيلان، 08 قارورات من بنفسجي جنسيان و30 قارورة من الماء الأوكسجيني"، الذين كانوا موضوع المراقبة الميكروبيولوجية، وقد وجدنا 34 عينة غير مطابقة للمقاييس (34%) ممثلة بـ 28 الإيوزين المائي (82.35%) 4 أزرق الميثيلان (11.76%)، 2 بنفسجي جنسيان (5.89%).

المراقبة بالعين المجردة لغطاء القارورة ولاصقات لمختلف القارورات وضع بعين الاعتبار غير المطابقة لمعظم العينات المراقبة بنسبة 95% والمأخوذة من 19 منتج مختلف.

عدم توفر أمن غطاء القارورات يوضح سبب تلوث هذه المنتجات الصيدلانية.

لقد قمنا بعزل وتعريف 26 سلالة من *Pseudomonas* "24 سلالة من *Pseudomonas aeruginosa* وسلالتين من *Pseudomonas fluorescence*"

هذه السلالات من *Pseudomonas* كانت موضوع لبحث عن الحساسية للمضادات الحيوية.

وقد وجدنا أن هذه السلالات من *Pseudomonas* قد أظهرت مقاومة للمضادات الحيوية، أعلى نسبة كانت بنسبة 75% لـ *Ceftazidime*.

الكلمات المفتاحية:

إيوزين المائي، أزرق الميثيلان، الماء الأوكسجيني، مراقبة النوعية الميكروبيولوجية

Obstract

The pharmaceutical preparations for external use are not necessarily sterile.

The microbiological control of these preparations responds to determinate criterions by the pharmaceutical product not necessarily sterile and considered wrongly as antiseptics. These 4 products: the aqueous eosin, the méthylen blue, purple of gentian and hydrogen peroxide, are made and marketed in Algeria.

In the total of 100 samples of pharmaceutical product not necessarily sterile, we find 32 battles of aqueous eosin, 30 battles of methylen blue, 08 battles of purple of gentian and 30 battles of hydrogen peroxide, have been microbiologically controlled.

34 battles were not conformable and represented by:

-28 samples of aqueous eosin(82.35%)

-04 sample Of methylen blue (11.76%)

-02 samples of purple of gentian (5.89%)

The visual control of the battles setting and stickers of different battles, proved the non-conformity of the majority of samples coming from 19 producers.

The absence of battles setting may explain the contamination of these products.

We have isolated and identified 26 isolats of pseudomonas; among

The 26 descent of pseudomonas: 24 descents *Pseudomonas aeruginosa* and 2 descents of *Pseudomonas fluorescens* »

These pseudomonas been the subject of systematic research for their sensitivity of antibiotic

Key words: Aqueous Eosin, Methylen bue, Purple of gentian, Hydrogen peroxide, Control of the microbiological quality

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAUX	TITRES	PAGES
TABLEAU I	Spectre d'activité, mode d'action et exemples d'utilisation des principaux antiseptiques et désinfectants inhibiteurs de la croissance.	06
TABLEAU II	Produits considérés à tort comme des antiseptiques.	07
TABLEAU III	Principales familles d'antiseptiques et leurs propriétés.	08
TABLEAU IV	Nature, mode et dates de prélèvement	30
TABLEAU V	Résultat du contrôle de pureté microbiologique des 100 lots de l'ensemble des produits contrôlés.	45
TABLEAU VI	La répartition des résultats du contrôle de pureté microbiologique des 34 lots non conformes.	47
TABLEAU VII	Résultats groupés des prélèvements non-conformes d'éosine aqueuse.	50
TABLEAU VIII	Résultats groupé des prélèvements non-conformes par présence de germes spécifiés	52
TABLEAU IX	Résultat des lots non conforme par un taux élevé de microorganisme.	55
TABLEAU X	Résultats de l'antibiogramme des <i>Pseudomonas</i>	57
TABLEAU XI	Extrait de tableau de la lecture de la galerie API 20E	AN II
TABLEAU XII	Tableau d'identification de l'espèce <i>Pseudomonas Aeruginosae</i> avec la galerie API 20E	AN II
TABLEAU XIII	Valeurs critiques des diametre des zonzs d'inhibition et des CMI pour <i>Pseudomonas Aeruginosae</i>	AN III

LISTE DES FIGURES

FIGURES	TITRES	PAGES
FIGURE 01	Structure de l'éosine.	16
FIGURE 02	Préparation de la solution mère.	31
FIGURE 03	Préparation des dilutions décimales	32
FIGURE 04	Méthode de dénombrement des germes aérobies viables	33
FIGURE 05	Méthode de dénombrement des levures et moisissures	34
FIGURE 06	Méthode de recherche des bactéries spécifiées.	36
FIGURE 07	Méthode de dénombrement des entérobactéries	38
FIGURE 08	Représentation des résultats du contrôle de pureté microbiologique de l'ensemble des produits examinés.	47
FIGURE 09	Représentation d'interprétation des prélèvements non conformes en pourcentage	47
FIGURE 10	Représentation de la totalité des prélèvements non conformes en pourcentage.	48
FIGURE 11	Représentation d'interprétation des prélèvements des lots d'éosine aqueuse non conformes en pourcentage	50
FIGURE 12	Représentation de la répartition des prélèvements non conformes d'éosine aqueuse sur les 6 Wilayas.	51
FIGURE 13	Représentation des prélèvements non conformes par présence de germes spécifiques.	53
FIGURE 14	Représentation des <i>Pseudomonas aeruginosa</i>(photos personnelles)	53
FIGURE 15	Représentation des germes viables totaux ensemencés en profondeur	56
FIGURE 16	Représentation de l'antibiogramme d'une souche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ((photos personnelles)	58
FIGURE 17	Représentation de l'antibiogramme d'une souche de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (photos personnelles)	58

Glossaire

Alkylation: est une réaction chimique constituée du transfert d'un groupement alkyle d'une molécule organique à une autre. Elle conduit donc à l'augmentation du nombre d'atomes de carbone d'un composé organique.

Antiseptie :"Opération au résultat momentané permettant au niveau des tissus vivants, dans la limite de leur tolérance, d'éliminer ou de tuer les micro-organismes et/ou d'inactiver les virus, en fonction des objectifs fixés. Le résultat de cette opération est limité aux micro-organismes et/ou virus présents au moment de l'opération" (**AFNOR Mars 1981 NF T 72-101**).

Asepsie :"Ensemble des mesures propres à empêcher tout apport exogène de micro-organismes ou de virus"

Bactéricide : effet d'un agent antibactérien entraînant la mort des bactéries mise à son contact

Bactéricidie : est généralement le fait d'agents bactéricides.

Bactériostase : Cessation de la reproduction par multiplication des germes.

Bactériostatique : effet d'un agent antibactérien, inhibant ou ralentissant la croissance des bactéries sans les tuer.

Bouteille PVC : PVC (polychlorure de vinyle) en plastique est généralement claire, striée, matériel résistant aux produits chimiques.

Champignon : microorganisme eucaryote non photosynthétique possédant une paroi rigide

Contamination : présence de microorganisme dans un milieu où normalement il est absent

Décontaminant : Produit ou procédé utilisé pour la décontamination. (Nicole Billast et al, 2000).

Désinfectant :"Produit ou procédé utilisé pour la désinfection ou la décontamination dans des conditions définies. Si le produit ou le procédé est sélectif ceci doit être précisé. Ainsi, un désinfectant ayant une action limitée aux bactéries est désigné par : désinfectant à action bactéricide." (**AFNOR Mars 1981 NF T 72-101**).

Désinfection : "Opération au résultat momentané permettant d'éliminer ou de tuer les micro-organismes et/ou d'inactiver les virus indésirables portés par des milieux inertes contaminés, en fonction des objectifs fixés. Le résultat de cette opération est limité aux micro-organismes et/ou virus présents au moment de l'opération" (**AFNOR Mars 1981 NF T 72-101**).

"On peut définir la désinfection comme l'opération visant à détruire les germes pathogènes dans le milieu extérieur, afin de prévenir l'apparition et empêcher la diffusion de maladies infectieuses". (**DJAFFAR BACHA, 1984**)

Eczéma : est une inflammation de la peau, non contagieuse accompagnée de rougeurs, de desquamations et de démangeaisons. Il existe plusieurs formes d'eczéma et cette affection peut toucher plusieurs types de population. Deux types d'eczéma peuvent s'observer : l'eczéma atopique et l'eczéma de contact.

Infection nosocomiales : du grec nosos, maladie et komeîn, soigner infection due le plus souvent à des bactéries pathogènes opportunistes, contractées en milieu hospitalier.

Infection : colonisation et croissance d'un microorganisme chez un hôte

Inhibition : réduction de la croissance microbienne par la diminution du nombre de microorganismes ou l'altération de leur environnement

Intertrigo : du fait de la macération et de la transpiration, les plis de la peau sont le siège privilégié des infections mycosiques ; on parle alors d'intertrigo. Les plus fréquentes concernent les pieds mais peuvent également atteindre d'autres zones : aine, aisselles, sous le sein.

Des infections cutanées peuvent apparaître aux plis de la peau. Tous n'ont pas la même cause, certains sont la conséquence d'infections bactériennes (stéroptocoque, staphylocoque) et d'autres d'infections mycosiques par des champignons microscopiques, dermatophytes ou candida.

L'oxydation : production d'ATP aux dépens de la force protonmotrice générée par le transport membranaire des électrons

La **houille** : est une [roche carbonée](#). C'est également une [roche combustible fossile](#) solide provenant de la décomposition d'organismes du [carbonifère](#).

Les mycobactéries : ce sont des bactéries acido-alcool-résistantes se présentent sous la forme de bacilles fins aérobies stricts et immobiles

Levure : champignon unicellulaire

Matériovigilance : a pour objet la surveillance des incidents pouvant survenir lors de l'utilisation du Dispositif médical, la surveillance des incidents ou des risques d'incidents résultant de l'utilisation des dispositifs médicaux après leur mise sur le marché, c'est-à-dire une fois que ces dispositifs médicaux ont franchi la porte des établissements de santé.

Moisissure : champignon filamenteux formant un mycélium

Pathogène : action d'un organisme parasite provoquant des dommages chez un organisme hôte

Porphyrie : les porphyries induites par des intoxications (métaux lourds), réversibles si l'intoxication n'a pas concerné le fœtus, l'embryon ou le jeune enfant ; et les porphyries congénitales, qui constituent des maladies essentielles et peuvent, dans une certaine mesure, être soignées. La porphyrie chronique, congénitale ou maladie de Gunther, se manifeste dès l'enfance et persiste à l'état adulte sous forme d'éruptions cutanées bulbeuses sur les régions du corps exposées au soleil ; elles s'accompagnent souvent de lésions dystrophiques diverses.

La porphyrie cutanée ressemble à la précédente, mais ne s'accompagne pas de dystrophies, et peut apparaître à l'âge adulte.

Stérilisation : "On peut considérer la stérilisation comme le stade « ultime » de la désinfection, c'est-à-dire l'étape qui vise la destruction totale des germes dans l'objet soumis à cette opération. "(DJAFFAR BACHA, 1984)

Tensioactif Un **tensioactif** ou **agent de surface** est un composé qui modifie la tension superficielle entre deux surfaces. Les composés tensioactifs sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire qu'elles présentent deux parties de polarité différente, l'une lipophile (qui retient les matières grasses) et apolaire, l'autre hydrophile (miscible dans l'eau) et polaire.

Une action létale : action mortelle sur les germes.

Varicelle : classique sous sa forme de maladie infantile éruptive fréquente, en milieu Tempéré, touche plus tardivement l'adulte en milieu tropical où elle est tout aussi caractérisée par sa très grande contagiosité, exposant ainsi femme enceinte et fœtus. Elle traduit la primo-infection par le virus varicelle-zona ou VZV, virus de la famille Herpesviridae. Ce n'est qu'en milieu tempéré et sans doute urbain, loin de l'équateur,

sauf vaccination, qu'elle survient spontanément dans plus de 90% des cas chez l'enfant entre 1 et 15 ans. Sa période d'incubation est de 14 jours en moyenne (de 10 à 21 jours).il existe un vaccin qui n'est pas recommandé en France. Généralement bénigne chez l'enfant bien portant, elle peut être redoutable et mortelle chez l'adulte non immunisé, l'immunodéprimé, la femme enceinte et le nouveau-né .

Virus enveloppée : en plus de leur capsid, ils possèdent une enveloppe lipidique qui est une structure entourant leur capsid

Virus nus : sont des virus qui ne possèdent pas une enveloppe lipidique

Liste des abréviations :

AFNOR : Association Française de normalisation

A.M.M : autorisation de mise sur el marché

AW : quantité d'eau libre, disponible dans un milieu (activity of water)

C-C.L.I.N : Centre de coordination de lutte contre les infections nosocomiales

C.M.B : concentration minimale bactéricide

C.M.I : consentration minimale inhibitrice

C.E.N : Un comité européen de normalisation

G/L : gramme par litre

H2O2 : eau oxygénée

ISO : organisation internationale de normalisation

IANOR : institue algérien de normalisation

ML : millilitre

P.V.P.I : Polyvinyl-Pyrrolidone Iodée

NF : norme française

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

SOMMAIRE

INTRDUCTION.....	01
------------------	----

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre I : Généralités sur les antiseptiques.....	02
--	-----------

I.1.Historique.....	02
I.2. Définition des antiseptiques	02
I.3. Différentes familles d'antiseptiques et leurs caractéristiques.....	03
I.4. Règlementation	09
I.4.1. Produits antiseptiques.....	09
I.4.2. Produits désinfectants.....	09
I.5. Normes AFNOR et EN.....	10
I.5.1. Principes des normes AFNOR.....	10
I.5.2. Principe de la normalisation européenne : normes EN (Comité Européen de Normalisation)	10
I.6. Mode d'action des antiseptiques et des désinfectants.....	11
I.7. Conservation des antiseptiques.....	12
I.8.Accidents généraux produits par les antiseptiques.....	12
I.9. Utilisation des antiseptiques en pratique médicale.....	13
I.10. Bonne utilisation des antiseptiques.....	13
I.11. Indications et choix des antiseptiques en dermatologie.....	14

Chapitre II : Définition des 4 différents types de produit mise en examen microbiologique.....	15
---	-----------

II.1.L'éosine.....	15
II.1.1.L'origine de l'éosine.....	15
II.1.2. Définition de L'éosine.....	16

II.1.3. Caractères de l'éosine.....	16
II.1.4. L'effet actif de l'éosine.....	16
II.1.5. Indication et contre indication.....	17
II.1.6. Mode d'utilisation.....	17
II.2. Bleu de méthylène	18
II.2.1. Définition	18
II.2.2. Nature du colorant.....	18
II.2.3. Mode d'utilisation	19
II.3. Peroxyde d'hydrogène (« eau oxygénée », H ₂ O ₂)	19
II.4. Violet de gentiane.....	19
II.4.1. Définition	19
II.4.2. Spectre d'activité	20
II.4.3. Dangers.....	20
Chapitre III : CONTROLE DE QUALITE MICROBIOLOGIQUES DES PRODUITS PHARMACEUTIQUES	20
III.1. Définition.....	20
III.2. Milieux de cultures et microorganismes.....	23
III.2.1. Milieux de cultures.....	23
III.2.2. Les microorganismes.....	26

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Présentation de lieu de stage.....	29
I.1. Matériel.....	29
I.2. Échantillonnage.....	29
I.3. analyse microbiologique	30
1.3.1. Dénombrement des germes viables totaux.....	31
1.3.1.1. Préparation de l'échantillon.....	31
1.3.1.2. Dénombrement sur plaque de gélose.....	32
1.3.1.2.1. Dénombrement des germes aérobies viables totaux.....	32
1.3.1.2.2. Dénombrement des levures et des moisissures	33
1.3.1.3 Lecture des résultats	34
1.3. 2. Recherche des germes spécifiés.....	35
1.4. Identification des germes isolés.....	39
1.4.1 Isolement et purification.....	39
1.4.2. Etude microscopique.....	39
1.4.3. Examens à l'état frais.....	39
1.4.4. Examen après coloration sur frottis.....	40
1.4.5. Recherche de l'oxydase- teste oxydase.....	41
1.4.6. L'identification par la Galeries API.....	41
1.4.7. L'antibiogramme.....	43

RÉSULTATS

I. Résultats du contrôle de pureté microbiologique.....	45
II. Interprétation et la répartition des résultats du contrôle de pureté.....	46
II.1. répartition des résultats du contrôle de pureté.....	46
II.2. Interprétation des résultats du contrôle de pureté par produit	48
II.2.1. Bleu de méthylène	49
II.2.2. Violet de gentiane	49
II.2.3. Eosine aqueuse.....	49
III. Résultats des lots non-conformes par présence de germes spécifiés.....	51
III.1. Interprétation des lots non conformes par présence de germes spécifiés par produits	53
III.1.1. Bleu de méthylène.....	54
III.1.2. Eosine aqueuse	54
IV. Résultats et Interprétation des lots non conformes par un taux élevé de microorganismes.....	55
V. Résultat de l'antibiogramme.....	56

DISCUSSION

Discussion.....	59
Conclusion.....	62

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

INTRODUCTION

Les antiseptiques qui ont une autorisation de mise sur le marché sont de véritables médicaments. Moins utilisés après l'apparition des antibiotiques, les antiseptiques et les désinfectants ont repris une place prépondérante dans la prévention et la lutte contre les infections nosocomiales.

Face aux problèmes thérapeutiques et de prévention des infections nous ne pouvons que recommander la rigueur et insister sur l'importance de la formation des personnels utilisateurs d'antiseptiques et désinfectants.

Devant la quantité de produits présents sur le marché, le choix est parfois difficile.

La sélection, outre les critères scientifiques et techniques, doit prendre en compte le conditionnement, la tolérance, la facilité d'emploi et le coût des produits.

L'utilisation appropriée de ces produits est d'autant plus nécessaire que les techniques médicales de plus en plus invasives induisent des risques infectieux importants.

L'éosine aqueuse, bleu de méthylène, violet de gentiane, eau oxygénée des produits considérés à tort comme antiseptiques, sont utilisés fréquemment en Algérie comme asséchant (l'éosine aqueuse, bleu de méthylène, violet de gentiane) ou comme des inhibiteurs de la croissance des anaérobies (eau oxygénée).

L'inconvénient de ces produits considérés à tort comme des antiseptiques se contaminent facilement (soit au cours de la production, ou après la 1^{er} utilisation).ces derniers posent un problème de santé publique car ils se contaminent facilement et sont à l'origine de surinfection

Le but de notre travail est de faire un contrôle de qualité microbiologique sur des lots tout venant (l'éosine aqueuse, bleu de méthylène, violet de gentiane, eau oxygénée) provenant de 05 wilayas d'Algérie (Alger, Blida, Constantine, M'sila et Oran) Selon la norme de la pharmacopée Européenne des 4 produits actuellement vendue dans les pharmacies.

Partie bibliographique

I. Généralités sur les antiseptiques:

I.1. Historique :

L'usage de médicaments ayant un pouvoir antiseptique remonte à l'antiquité. Hippocrate recommande l'utilisation de vinaigre et de vin pour traiter les blessures. Et pour la première fois au XVIIIème siècle que le mot **antiseptique** fut employé par le médecin militaire écossais PRINGLE. Il classa un grand nombre de substances appliquées sur la peau et les plaies (camphre, acides...). Peu après LABARRAQUE recommanda de traiter les infections superficielles par une solution d'hypochlorite de sodium qui a depuis conservé son nom (liqueur de LABARRAQUE). L'efficacité des hypochlorites fut révélée par SEMMELWEIS afin de prévenir la transmission manuporté des germes responsables d'épidémie d'infection puerpérales, puis Pasteur et Koch établirent les bases raisonnées de l'asepsie et antiseptie mises immédiatement en application par le chirurgien LISTER (BILLAS *et al.*, 2000 ; VAUBOUROLLE, 2007).

A partir de 1970, l'élaboration par l'AFNOR. (Association française de normalisation) de protocoles normalisés d'étude a permis une meilleure connaissance des propriétés antimicrobiennes des antiseptiques et désinfectants. A la même période, la pharmacopée française introduit en 1985 une note pro-pharmacopée sur les préparations antiseptiques. La monographie en vigueur actuellement date de 1990.

Un comité européen de normalisation CEN TC 216 « antiseptiques et désinfectants » a été créé dans le but d'harmoniser les normes dans les différents pays européens (BILLAS *et al.*, 2000).

I.2. Définition des antiseptiques :

le mot **ANTISEPTIQUE** a d'abord été écrit en anglais « antiseptic » à partir du grec "anti" : contre et "sepsis" : putréfaction (AFNOR, 1981)

L'asepsie fait appel à des agents qui sont de véritables médicaments anti-infectieux appelés antiseptiques (MARCK, 2010). L'antiseptie correspond à l'élimination, l'inactivation ou la destruction des microorganismes sur les tissus vivants (peau et muqueuses) et peut être définie comme une désinfection des tissu vivants. (GAZENDEL *et ORECCHIONI*, 2001).

Les antiseptiques sont des molécules possédant une activité antimicrobienne rapide, transitoire et peu spécifique qui les oppose aux antibiotiques (FLEURETTE *et al.*, 1995). Leurs spectre d'activité est propre à chaque famille d'antiseptiques et peut couvrir les bactéries, les champignons (levures, dermatophytes), les spores, les virus et les parasites. L'activité sur les prions est mal connue, mais probablement nulle pour la majorité des antiseptiques (MCDONNELL *et RUSSELL*, 1999).

L'activité des antiseptiques in vivo est difficile à évaluer. Les plus efficaces entraînent une diminution des microorganismes cutanés en quelques minutes ; les autres sont seulement bactériostatiques, leurs utilisation clinique implique comme pour tous les médicaments que soient bien connues leurs actions principales (effet microbicide), leurs pharmacocinétiques, leurs effets secondaires et leurs interactions, leurs modes d'utilisations et leurs indications respectives doivent être parfaitement définis (**MARTIN, 2008**).

L'activité des antiseptiques a été standardisée par l'AFNOR. Un antiseptique est dit bactéricide s'il réduit in vitro la quantité initiale de cinq souches données de bactéries d'un facteur 10^5 après un temps de contact de 5 minutes. L'activité des antiseptiques est réduite dans de nombreuses circonstances physiques ou (bio) chimiques, en particulier lors de la présence de matières organiques (sang, sérum, pus, etc.). La connaissance de cette limite est essentielle pour appréhender l'activité des antiseptiques in vivo. Comme les antibiotiques, les antiseptiques peuvent être l'objet d'une résistance naturelle ou acquise de la part de certains micro-organismes. Certaines bactéries sont devenues résistantes à la fois à des antibiotiques et à des antiseptiques (**MCDONNELL et RUSSELL, 1999**).

I.3. Les Différentes familles d'antiseptiques et leurs caractéristiques :

Les différentes familles d'antiseptiques et leurs caractéristiques se présentent comme suit :

- **Halogènes :**

Sont des agents antimicrobiens et antiviraux très efficaces ; certains, comme le chlore, le brome et le fluore, assez irritants, sont employés surtout comme désinfectants ; par contre l'iode, mieux toléré par la peau et les muqueuses, est fréquemment utilisé comme antiseptique. (**FLEURETTE, 1998**).

- **Biguanides :**

La chlorhexidine dérivé fortement basiques des biguanidines. La chlorhexidine est utilisée généralement sous forme de digluconate soluble dans l'eau. elle est à usage unique, et en solution moussantes peuvent être conservées jusqu'à 10 jours (**CROUZILLES, 2009**). Les sels sont très solubles dans l'éthanol et l'isopropanole (**FLEURETTE, 1998**).

- **Alcools :**

Les plus utilisés sont l'alcool éthylique, l'alcool isopropylique, l'alcool benzylique, les éthylènes et propylèneglycols. Ils sont utilisés pour l'antisepsie de la peau saine

(FLEURETTE, 1998). Leurs temps de contact et de 30 secondes et sa conservation après ouverture est d'un mois (CROUZILLES, 2009).

- **Ammoniums quaternaires :**

Le chlorure de benzalkonium est le représentant le plus connu de cette famille. Ce sont des agents tensioactif (surfactifs cationiques). Ils n'ont aucune activité sur les mycobactéries et les champignons. Ils se fixent sur les surfaces inertes (filtre, métal, verre...). Ils sont peu toxique et peu irritants, mais des réactions d'hypersensibilité sont possibles. Ils sont le plus souvent associés à d'autres principes actifs en raison de leur propriété tensioactive mais les savons anioniques les neutralisent, ce qui en limite l'emploi. De plus, certaines solutions se sont retrouvées contaminées en cours d'utilisation, ce qui finalement en fait des produits peu à peu abandonnés (exemples: Cetavlon 5%, Stérilène 0,5%, Asepto compresse imprégnée) (GAZENDEL, 2007).

- **Carbanilides :**

Les carbanilides sont des diphenylurées solubles dans l'eau en présence de tensioactifs. Elles sont décomposées par le chauffage en chloroanilines. (FLEURETTE, 1998).

- **Diamidines :**

Les diamidines aromatiques furent connues en 1920 pour leurs propriétés antidiabétiques ; leur action antimicrobienne fut d'abord décrite vis-à-vis des trypanosomes, des leishmanies et des pneumocystis (HUGO et RUSSELL, 1992) ; la pentamidine est encore utilisée dans le traitement des infections causées par ces microorganismes. Plus tard des investigations systématiques furent entreprises pour définir leur activité antibactérienne. (FLEURETTE *et al.*, 1995).

- **Antiseptiques divers :**

La famille des antiseptiques divers comprend essentiellement :

-les produits a usage dermatologique : acide borique, acide salicylique ; acide lactique ; sulfates de cuivre et de zinc et nitrate d'argent. ces produits ont une action essentiellement bactériostatique et détergente.

- L'hexétidine est une solution antiseptique buccal. (CROUZILLES, 2009).

- **Antiseptiques déconseillés :**

Certains antiseptiques sont déconseillés à cause de leurs propriétés :

- Les dérivés mercuriels sont des produits allergisants et de spectre étroit ; essentiellement bactériostatique.

- L'hexamidine est un produit allergisant, de spectre étroit (Gram+ et champignons), induisant une sélection bactérienne en cas d'utilisation prolongée. **(CROUZILLES, 2009).**

- **Faux antiseptiques :**

Certains produits sont considérés à tort comme des antiseptiques :

- Le peroxyde (eau oxygénée) est un produit hémostatique et faiblement bactériostatique. **(CROUZILLES, 2009).**
- Les dérivés du triphénylméthane (vert malachite, vert de méthyle, violet de gentiane), les dérivés de l'acridine (Chromargon) ou des produits divers : cristal violet, éosine aqueuse, sont des substances très utilisées en dermatologie. Ce sont des bons agents tannants **(GAZENDEL, 2007).**
- L'éosine aqueuse, la solution de Millian et le violet de gentiane sont des colorants qui possèdent des Propriétés asséchantes.

Ces produits ne sauraient être utilisés seul pour une visée antiseptique. Par ailleurs, les colorants présentent l'inconvénient de masquer les tissus à traiter, nuisant ainsi à leur observation et leur appréciation ultérieure. **(CROUZILLES, 2009).**

Le spectre d'activité et exemples d'utilisation des principaux antiseptiques et désinfectants inhibiteurs de la croissance microbienne sont représentés dans le **tableau I.**

Tableau I : Spectre d'activité et exemples d'utilisation des principaux antiseptiques et désinfectants inhibiteurs de la croissance **(GAZENDEL et ORECCHIONI, 2001).**

Antiseptiques et désinfectants inhibiteurs de la croissance					
Groupe chimique	Spectre d'activité				Exemples d'utilisation
	Bactérie sauf mycobactéries	Spores bactériennes	champignons	virus	
Dérivés de métaux lourds : .Dérivés mercuriels et Mercurochrome .Thiomersal .Mercurobutol .Sels d'argent .Nitrate d'Ag	Bacterios tatiques ++ ++ G+ ++ G- -	- - - - -	Fongistatique - ? -	+ - - -	Désinfection des plaies, collyres Collyres
Colorants : .Dérivés du triphénylméthane « vert malachite, violet cristal, vert brillant » .Dérivés d'acridine : .Bleu de méthylène	G+ +++ Activité faible	- -	- -	- -	Antiseptiques + préparation des milieux de culture sélectifs car inhibiteurs de nombreuses bactéries Collyres

(Légende : activité forte : +++, moyenne ++, faible +, nulle-)

Les produits considérés à tort comme des antiseptiques sont représentés dans le **tableau**

II :

Tableau II : Produits considérés à tort comme des antiseptiques (PLACET-THOMAZEAU *et al.*, 2000-2001).

Famille chimique	Nom des principes actifs et commercial	Indications	Contre-indications Précautions d'emploi	Péremption n après ouverture
Peroxyde d'hydrogène	Eau oxygénée à 3 % (10 volumes)	Nettoyage des plaies et action Hémostatique précédant l'utilisation d'un antiseptique -Inhibiteur de la croissance des germes anaérobies.	Eviter le contact avec l'œil	8 jours
Les colorants	Eosine aqueuse à 2 %	Action desséchante Pas de propriété antiseptique Traitement d'appoint des affections de la peau primitivement bactériennes ou susceptibles de se surinfecter, notamment érythème fessier du nourrisson, eczémas.	Hypersensibilité	- Un flacon ouvert se contamine très rapidement (délai d'utilisation après ouverture : 24h)
	Solution de Millian (vert de méthyl - cristal violet) : Solution aqueuse à 0,25 %	Action asséchante Traitement d'appoint de l'érythème fessier du nourrisson Intertrigo candidosique Dermatoses suintantes, bulleuses, vésiculeuses.	Coloration en violet - brun de la peau -linge	Non renseigné
	Violet de gentiane : solution aqueuse 1%	Action desséchante		Non renseigné

Les principales familles d'antiseptiques, ainsi que leurs propriétés sont représentées dans le **tableau III**

Tableau III : Principales familles d'antiseptiques et leurs propriétés (CROUZILLES, 2009).

Type de solution			Spectre d'activité					Précautions / observations	
alcoolique	aqueuse	moissant	+	-	K	fo	irus		
Alcools									
Mo difies a60°			++	++	+++*		++	+	Desséchant ne pas à utiliser sur les muqueuses et chez les nourissants de moins de 30 mois
Mo difies a70°									
Halogènes iodés									
Alc ool a2%	Bétadine dermique	Bétadine scrub	++	++	++		++	++	Hypersensibilité a l'iode ne pas utiliser avec les organon-mercuriel et chez les nourissants de moins de 30 mois
Bét adine alcoolique	Bétadine gynécologique								
	Bétadine bain de bouche								
Halogènes chlorés									
	Dakin stabilisé cooper		++	++	+++*		++	+	Conserver a l'abri de la lumière et température inferieurs a 15°C. surtout si non stabilisé
Biguanides									
Hib itane septéal	Hibidil	Hibiscru b plurexid	++	+			+		Incompatibilité avec presque tous les autres antiseptiques.pas d'application sur les méninges et sur les tympans.
Ammoniums quartenaires									
Cet avlon alcoolique		Cétavlon Sterlane	++	+	+++*		++	+	Ne pas utilisé avec les composés anioniques ni sur les muqueuses.
Ster lane tein ture									
Faux antiseptiques									
	Eau oxygénée 10vol Permanga nate de potassium						-		Produit desséchant, risque de brulures, donne une coloration brune à la peau

Légende : +++très actif, ++moyennement actif,- inactif, *Inactivé à la présence des protéines,

BK : bacille de koch.

I.4. Règlements :

I.4.1. Produits antiseptiques :

Les "préparations antiseptiques" font l'objet d'une monographie dans la Pharmacopée française.

Les antiseptiques avec autorisation de mise sur le marché (AMM) sont de véritables médicaments et doivent répondre aux exigences de la Pharmacopée: activité avec et sans substances interférentes, propreté microbiologique ou stérilité, étiquetage. Les préparations sans AMM relèvent de la législation sur les produits d'hygiène corporelle et rentreront dans le cadre de la législation européenne "Biocides" Directive 98/8/CE. Leur activité doit être établie selon les normes AFNOR. (BILLAST *et al.*, 2000).

I.4.2. Produits désinfectants :

La réglementation distingue trois types de désinfectants en fonction du domaine d'utilisation de ces produits :

- En France Les procédés et produits destinés à la désinfection par voie aérienne en cas de maladies à déclaration obligatoire sont soumis à un agrément de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. Cet agrément est délivré à des produits ayant démontré une activité bactéricide et/ou fongicide et/ou virucide et/ou sporicide, selon des essais standardisés.
- Les produits désinfectants de dispositifs médicaux sont soumis à la législation européenne des dispositifs médicaux depuis le 14 juin 1998. Cette législation, dont l'objectif est la libre circulation des produits au sein de la communauté européenne, impose le marquage CE des dispositifs médicaux mis sur le marché. Ce marquage CE n'est pas une attestation de conformité à des normes mais une attestation indiquant que le dispositif médical est conforme à des exigences essentielles de sécurité, relatives à la conception, à la construction et à l'information (étiquetage et notice d'instructions) fournie par le fabricant.
- Les autres produits désinfectants (par exemple, ceux destinés à la désinfection des sols et surfaces) relèvent de la réglementation européenne relative aux biocides (BILLAST *et al.*, 2000).

I.5. Normes AFNOR et EN :

I.5.1 Principes des normes AFNOR :

Date de la création de l'AFNOR : 1926 L'étude de l'activité des antiseptiques et des désinfectants a été standardisée par l'Association Française de Normalisation (AFNOR) depuis 1975. Les normes AFNOR décrivent des méthodes *in vitro* permettant d'évaluer la concentration minimale du produit qui, dans des conditions déterminées de température et de temps de contact, provoque la réduction, dans des proportions préalablement définies, d'une population initiale microbienne.

La réalisation de ces normes s'effectue en trois phases :

- Mise en contact du produit à tester avec un inoculum microbien;
- Annulation de l'activité du produit à l'issue du temps de contact selon deux méthodologies possibles :
 - par dilution/neutralisation du mélange (microorganismes / produit),
 - par filtration du mélange sur une membrane.
- Mise en culture des germes survivants par culture en milieu approprié.

Les tests sont réalisés à la température de 20°C. (BILLAST *et al.*, 2000).

I.5.2. Principe de la normalisation européenne: Normes EN (Comité Européen de Normalisation)

Les normes européennes, comportent des normes de base (norme dites de phase 1) et des normes d'application (normes de phase 2 et 3) adaptées au domaine d'utilisation (par exemple : désinfection des surfaces en agro-alimentaire, désinfection des dispositifs médicaux...):

***Phase 1** : Essai en suspension pour évaluer l'activité de base du produit. Cette phase, appliquée aux activités bactéricides (NF EN 1040 ou NF T 72-152) et fongicides (NF EN 1275 ou NF T 72-202), correspond aux anciennes normes AFNOR NF T 72-150/151 et NF T 72-200/201.

***Phase 2** : Essai en laboratoire dans des conditions les plus représentatives possibles de la pratique hospitalière pour déterminer la concentration efficace et l'indication. Cette phase est divisée en 2 étapes :

- **1ère étape** : essai en suspension comme pour la phase 1, dans des conditions plus proches de la pratique, par exemple des espèces de micro-organismes spécifiques de l'application et/ou en présence de substances interférentes définies (protéines, eau dure, etc. ...).

- **2ème étape** : essai simulant la pratique, par exemple sur porte germes pour les désinfectants de surface, sur des mains artificiellement contaminées pour les produits destinés à la désinfection des mains par lavage ou friction.

* **Phase 3** : Essai sur le terrain, dans des conditions pratiques d'utilisation, afin de confirmer la concentration efficace (par exemple, ces essais peuvent être pratiqués avec des souches hospitalières). (**PARENT et al., 1998; BILLAST et al., 2000**).

L'institut algérien de normalisation IANOR reprend les mêmes normes.

I.6. Mode d'action des antiseptiques et des désinfectants :

Les antiseptiques sont capables d'inhiber la croissance des micro-organismes (bactériostase, fongistase, virustase), ou d'avoir une action létale (bactéricidie, fongicidie, virucidie, sporicidie). Certains antiseptiques et désinfectants présentent ces deux modes d'action en fonction des doses. D'autres ont toujours une action létale ou toujours une action bactériostatique ou fongistatique quelle que soit la concentration utilisée.

La rémanence désigne l'effet antimicrobien de l'antiseptique persistant sur la peau (ou du désinfectant persistant sur une surface). Le mécanisme d'action des produits varie d'une famille d'antiseptiques à l'autre : coagulation des organites intracellulaires, altération de la membrane.

Selon leur nature et leur concentration, les antiseptiques et désinfectants ont une ou plusieurs cibles à l'intérieur de la cellule. Ils doivent donc traverser la paroi cellulaire pour exercer leur action (**BILLAST et al., 2000**).

Les spores bactériennes sont très résistantes aux antiseptiques tout comme à la chaleur. Sur les virus, le mode d'action de ces composés est mal connu ; le phénol et le chlore inactivent la plupart des virus (**DORVAULT, 1995**).

I.7. Conservation des antiseptiques :

La Conservation de l'efficacité bactéricide nécessite certaines précautions, notamment dans les services hospitaliers.

1. Utiliser de l'eau stérile pour effectuer les dilutions; certains antiseptiques sont inactivés par la chaleur, la lumière, absorbés par les plastiques et sont instables en solution diluée (**FLEURETTE, 1998**).

2. Le risque majeur est celui de la contamination microbienne par des germes résistants ; ces contaminations ont été décrites à de nombreuses reprises avec les ammoniums quaternaires, les phénoliques, la chlorhexidine... les germes isolés sont les plus souvent des *Pseudomonas* et des *Alcaligènes* (**FLEURETTE, 1998**).

3. Les conduites à tenir pour la conservation des antiseptiques sont les suivantes :

- la fabrication des antiseptiques doit répondre à des normes rigoureuses, les flacons doivent être stériles, de veiller au bon état du bouchon (étanchéité, stérilité, proscrire les bouchons de liège)

-éviter la stagnation d'eau au niveau de l'orifice.

Enfin le conditionnement d'utilisation doit être petit, de manière à réduire le plus possible l'usage répétitif du même flacon ; dans certains cas, il doit être unitaire (**FLEURETTE, 1998**).

I.8. Accidents généraux produits par les antiseptiques :

À l'occasion de l'ingestion ou d'injection accidentelle d'une quantité importante, on observe les effets pharmacodynamiques et toxiques de la molécule d'antiseptique. Moins connus sont les effets liés à l'absorption percutanée chronique de ces molécules ; les méthodes pharmacocinétiques toxicologiques actuelles plus précises permettent de mieux connaître ces effets secondaires. De nombreux antiseptiques sont toxiques pour les tissus et les cellules en culture, les leucocytes (action sur les membranes cellulaires, les lysosomes et certaines activités métaboliques, inhibition de la phagocytose).

Les principaux accidents cutanés provoqués par les antiseptiques sont de trois ordres :

-irritation cutanée,

-sensibilisation cutanée liée au pouvoir allergique de nombreuses molécules,

-photosensibilisation,

L'utilisation des antiseptiques retentit aussi sur les flores microbiennes.

-sur la peau et les muqueuses, l'application répétée entraîne une diminution de la flore normale, qui peut être remplacée par une flore de surinfection.

-des modifications écologiques de l'environnement peuvent être observées telles que la sélection de souches résistantes et une substitution de flore (**FLEURETTE, 1998**).

I.9. Utilisation des antiseptiques en pratique médicale :

Les antiseptiques sont utilisés pour la prévention et le traitement des maladies infectieuses dans trois circonstances :

-antiseptie de la peau saine.

-antiseptie de la peau lésée.

-antiseptie des muqueuses et des séreuses.

Les produits à large spectre, permettant de réduire la plupart des espèces bactériennes, seront utilisés dans la prévention du risque infectieux : ils sont qualifiés d'antiseptiques

majeurs. Ils doivent réduire la flore résidente en partie, sans déséquilibrer l'écosystème cutané.

Les autres produits sont réservés au traitement de certaines affections dermatologiques, où l'on cherche à détruire précisément les germes à l'origine de l'infection cutanée.

Les protocoles d'emploi ne sont pas encore standardisés, mais ils obéissent à quelques règles tenant compte du but recherché et de l'efficacité antimicrobienne du produit choisi et des critères d'innocuité. Les conditions d'utilisation de l'antiseptique mais également l'état du revêtement cutané-muqueux conditionnent l'activité de l'antiseptique.

(FLEURETTE, 1998 ; CROUZILLES, 2009)

I.10. Bonne utilisation des antiseptiques:

Pour une bonne utilisation des antiseptiques il faut respecter certaines règles :

-Ne pas trop diluer (inefficacité), mais diluer suffisamment (intoxicité pour les tissus) : respecter les indications pour chaque produit.

-Respecter les utilisations simultanées de plusieurs produits, rincer soigneusement toute trace de détergent, éliminer les matières organiques (pus débris divers...) qui diminuent l'efficacité.

-Eviter d'appliquer, sans raison, de pansement occlusif.

-Ne pas utiliser de solutions périmées.

-Un flacon ouvert est un flacon bactériologiquement suspect, des solutions aqueuses ou de bromure de cétrimonium souillées par *Pseudomonas aeruginosa* ne sont pas rares. Pour assurer une bonne qualité bactériologique : choisir chaque fois que cela est possible utiliser des mini doses stériles à usage unique, ou des flacons de petit volume ; dater le flacon dès l'ouverture et le conserver à l'abri de la chaleur ; penser à laver et désinfecter périodiquement les distributeurs d'antiseptiques dans les collectivités **(DORVAULT ,1995).**

I.11. Indications et choix des antiseptiques en dermatologie :

Le choix d'un antiseptique repose sur :

- l'efficacité et la bonne tolérance de la molécule. L'efficacité est appréciée a priori par un spectre antimicrobien large, incluant la flore résidente et les agents pathogènes cutanés habituels, par un délai d'action bref (moins de trois minutes), par une action suffisamment rémanente (plusieurs dizaines de minutes), par une activité pas ou peu diminuée par la présence de matières organiques et, éventuellement, par une présentation adaptée à l'usage dermatologique. La bonne

tolérance associe une causticité modeste ou absente, un risque d'eczéma faible et des effets systémiques rares ou sans gravité. L'antiseptique idéal n'existe pas et, en pratique dermatologique, les qualités requises ne sont réunies que pour un petit nombre d'antiseptiques : chlorhexidine et povidone iodée pour l'essentiel, qui sont les seuls antiseptiques à bien connaître et à prescrire. L'association de ces antiseptiques à l'alcool éthylique est synergique et utile.

L'intérêt des antiseptiques en peau saine est admis par tous avant une effraction cutanée telle qu'une ponction veineuse ou a fortiori avant une chirurgie. Mais la démonstration de l'utilité des antiseptiques en peau lésée n'a été que rarement faite (**WOLKENSTEIN, VAILLANT 1996**).

Les études contrôlées bien conduites comparant un antiseptique au savonnage seul, ou un antiseptique au nettoyage mécanique (à la douche par exemple) manquent. Les critères de jugement utilisés dans nombre des travaux publiés ne sont pas adaptés à la pratique clinique. Les seuls critères pertinents nous semblent en effet être la survenue d'une (sur)infection microbienne locale ou d'une infection généralisée, et non la quantification du nombre de germes présents aux sites traités, simple reflet de l'intensité de la colonisation microbienne. On dispose en revanche d'études plus nombreuses comparant l'efficacité microbiologique des antiseptiques entre eux ou comparant antiseptiques et antibiotiques locaux. Il faut garder en mémoire que, quelle que soit la dermatose traitée, c'est la restauration de l'intégrité cutanée qui constituera le meilleur antiseptique (**STALDER JF, FLEURY M, SOURISSE M et al ; 1994**). Dans l'état actuel de nos connaissances, et compte tenu d'effets indésirables non rares, l'utilisation des antiseptiques en peau lésée doit donc être « raisonnablement empirique », c'est-à-dire réservée aux dermatoses bulleuses étendues où, de façon consensuelle, les antiseptiques pourraient limiter le risque d'infection grave. Dans tous les autres cas, l'évaluation du rapport bénéfice/risque doit être systématique, et le souci de ne pas favoriser l'émergence de souches résistantes toujours présent à l'esprit. Si l'on a recours à un antiseptique, le choix se limitera bien souvent à l'alternative chlorhexidine/povidone iodée. La bonne connaissance par le praticien des spécificités d'un petit nombre de spécialités (principes actifs, spectre antimicrobien, effets indésirables, conditionnement, conservation et prix) est

nécessaire et suffisante pour faire face à la majorité des situations. (VAILLANT & MARTIN ., 2005)

II. les faux antiseptiques (éosine aqueuse, bleu de méthylène, violet de gentiane, eau oxygénée) :

II.1. L'éosine :

II.1.1.L'origine de l'éosine :

L'éosine est fabriquée à partir des hydrocarbures issus du goudron houille (MARCK ,2010).

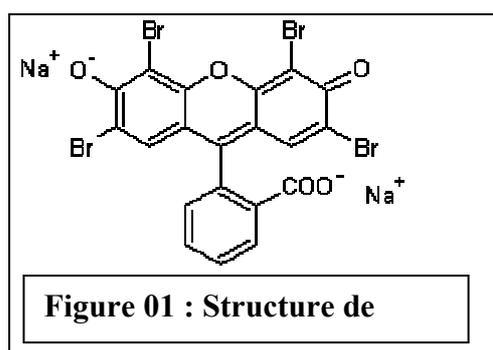
L'éosine se produit dans des conditions suivantes : lorsqu'on traite par l'acide phtalique connu sous le nom de résorcine, on obtient une matière colorante jaune qui a été nommée fluorescéine parce que sa dissolution aqueuse, additionnée d'ammoniaque, présente une belle fluorescence jaune

La fluorescéine soumise à l'action du brome produit par substitution différents corps le plus intéressant est l'éosine (FIGUIER, 2009).

II.1.2.Définition de L'éosine :

L'éosine disodique est un mélange de colorants obtenu par la bromation de la fluoresciene.

Elle présente une fluorescence rosée spéciale et qui est très employée comme colorant en histologie, est une fluorescéine tetrabromée C₂₀H₈Br₄O₅. Sel disodique de la 4'.5'-dibromo-2'.7'-dinitro fluorescéine, l'éosine est inscrit à la Xème édition de la pharmacopée (DORVAULT, 1995 ; MARTIN, 2008).



DORVAULT, 1995.

On l'utilise en solution aqueuse à 1% ou 2% ou en solution alcoolique. (DORVAULT, 1995)

L'éosine seule n'étant pas un produit antiseptique, pour des applications locales, elle est associée à de l'alcool à 1à2% qui, confère à la solution des propriétés antibactériennes et

antifongiques. La solution alcoolique d'éosine révèle une forte fluorescence verte. **(DORVAULT, 1995)**

II.1.3. Caractères de l'éosine:

Poudre cristalline rouge, assez soluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool, pratiquement insoluble dans l'éther.

A conserver en récipient bien étanche.

II.1.4. L'effet actif de l'éosine :

L'éosine possède un pouvoir asséchant et tannant, son application entraîne une coloration de la peau qui risque de masquer une dermatose sous jacente.

Les solutions aqueuses se contaminent rapidement ; il est donc conseillé d'utiliser des monodoses de solution stérile, ou de ne pas conserver le flacon plus de 24 heures après l'ouverture. **(DORVAULT, 1995).**

II.1.5. Indication et contre indication :

Ne pas l'utiliser avec un autre antiseptique (risque d'incompatibilité).

On l'utilise en traitement d'appoint de certaines affections dermatologiques **(DORVAULT, 1995).**

Compte tenu des interférences possible (antagonisme, inactivation, etc.), l'emploi simultané ou successif d'antiseptiques est à éviter. Enfin l'éosine peut être responsable de phénomènes de photo sensibilisation au niveau des régions découvertes. **(VIDAL, 1995)**

II.1.6. Indications thérapeutiques en Algérie :

L'éosine aqueuse est appliquée sur :

1. Érythème fessier (dermite du siège) : c'est une infection cutanée caractérisée par une rougeur plus ou moins intense sèche, parfois exsudative pouvant s'ulcérer en surface
2. Plaies et pour la varicelle **(MAUTRAIT et RAOULT, 1994).**
3. Soins du cordon ombilical :

Il était de tradition d'utiliser sur le cordon ombilical du nouveau-né de l'éosine en solution **aqueuse** à 2 %. L'éosine était utilisée pour son pouvoir « asséchant » ou « antiseptique ». De fait, l'utilité de l'éosine a été remise en cause, d'autant qu'il peut arriver que la solution **aqueuse** soit contaminée. La crainte de survenue d'une omphalite a alors fait proposer des antiseptiques, avec le risque d'un retard de chute du cordon et de sélection de germes plus résistants.

Dans les pays développés, il y a le choix entre ne rien mettre et l'utilisation d'antiseptiques. Chez des nouveaux nés plus exposés en raison de mauvaises conditions

d'hygiène, l'application d'un antiseptique 1 à 2 fois par jour est certainement raisonnable (LORETTE *et al*, 2007).

4. Intertrigo (intertrigo suitant).

5. Porphyries (vulvite microbienne).

6. Eczémas (MAUTRAIT et RAOULT, 1994).

7. Circoncision.

II.2. Bleu de méthylène :

II.2.1. Définition :

C'est une poudre cristalline, bleu sombre à reflets cuivrés, il est soluble dans 28% d'eau froid, moins soluble dans l'alcool et insoluble dans l'éther.

Il a été utilisé contre le paludisme et contre différentes infections bactériennes.

Il s'agit en fait d'un antiseptique peu puissant mais qui a l'avantage d'être dépourvu de toxicité. Le bleu de méthylène est cependant quelquefois irritant lorsqu'il est utilisé pour le traitement oculaire, un contact prolongé pouvant être responsable d'une coloration bleue du fond d'œil.

Il est actuellement utilisé dans les collyres et en stomatologie (FLEURETTE *et al.*, 1995).

II.2.2. Nature du colorant :

Le bleu de méthylène, ou chlorhydrate de tétraméthylthionine, dont la base est une base ammonium, est obtenu par l'action de l'oxyde d'argent ; cette base a été appelée bleu Borrel par LAVERAN. C'est un colorant basique progressif.

Il fait partie du groupe des Quinones-imides, section des Thiazines, qui sont des colorants sulfurés dans lequel deux noyaux benzéniques sont unis par un anneau fermé constitué d'un atome d'azote, d'un atome de soufre et de 4 atomes de carbone.

Dans ce groupe, on va trouver : la thionone (ou violet de Lauth), le bleu de toluidine, le nouveau bleu de méthylène (qui est dérivé de l'éthyltoluidine, et non de la diméthylaniline comme son homonyme ; ils sont très voisins dans leur action !), le violet de méthylène, l'azur de méthylène et le vert de méthylène (bleu de méthylène nitré).

ATTENTION à ne pas confondre avec les bleus de méthyle (la fuchsine acide (rubine acide, Magenta S), le vert lumière (Lichtgrün ou vert acide S), le bleu à l'eau, les bleus 1 et

2 de Saint-Denis, le bleu de diphénylamine, le bleu coton, le bleu de Chine, le bleu naphthyle, le bleu d'isamine... qui constituent toute une famille de colorants bleus acides. (LECOMTE, 2013).

II.2.3. Indication thérapeutique en Algérie :

Il est utilisé dans les infections urinaires le plus souvent en association avec des antibactériens urinaire (GAZENDEL, 2007).

Les aphtes, gingivite (badigeonnage buccal) (GAZENDEL, 2007).

II.3. Peroxyde d'hydrogène (« eau oxygénée », H₂O₂):

C'est un Oxydants non chlorés non iodés, son activité antiseptique repose sur une dénaturation des protéines et des acides nucléiques microbiens. Elle est limitée à certains Gram positif et à certains virus, dont le VIH, et est inhibée par le contact avec les matières organiques qui entraînent une effervescence. Celle-ci peut être utile pour le nettoyage mécanique d'une plaie (éliminer les germes anaérobie). L'eau oxygénée est hémostatique pour les plaies superficielles, la dermabrasion par exemple. L'eau oxygénée peut être irritante pour la peau ; son utilisation est proscrite à proximité des conjonctives. Elle est commercialisée en solution 10 volumes. Elle doit être conservée à l'abri de la chaleur et de la lumière. (VAILLANT & MARTIN, 2005).

II.4. Violet de gentiane :

II.4.1. Définition :

Le Violet de Gentiane (ou méthylrosaniline), fait partie des Violet de méthyle, qui constituent un groupe de colorants basiques. C'est un mélange de chlorhydrates de violets pentaméthylés (violet de méthyle et violet de Paris - pentaméthylpararosaniline) et hexaméthylé (violet cristal ou Cristal violet) (LECOMTE, 2013) .

Le violet de gentiane est un dérivé du trimpherylméthan, c'est un mélange partiellement purifié de chlorures de diverses méthylrosanilines (hexa, penta, et tetraméthylpararosaniline)

(FLEURETTE et al., 1995).

II.4.2. Spectre d'activité :

C'est un bacteriostatique, surtout actif sur les bacteries Gram positif ; la resistance des bacteries à Gram negatif serait due à l'imperméabilité de leur enveloppe aux colorants (FLEURETTE et al., 1995), inactif sur les Spores bacteriennes, les champignons et les virus (GAZENDEL et ORECCHIONI, 2001) .

II.4.3. Indication thérapeutique en Algérie :

-Il est utilisé en stomatologie pour les aphtes et sur les plaies ouvert « asséchante et tannante »

II.4.4.Dangers :

Considérons ces colorants avec prudence ! L'ingestion sous forme pure est très toxique, et la préparation en solution aqueuse ou alcoolique est toxique per os, vu la présence d'aniline ou de phénol (LECOMTE ,2013) .

III. Contrôle de qualité microbiologique des produits pharmaceutiques :

III.1. Définition :

- **Contrôle :**

Selon le HIR (2001), le mot contrôle peut être utilisé dans le sens de vérification ou dans celui de maîtrise. Le contrôle consiste à mesurer une ou plusieurs caractéristiques d'une entité et à comparer les résultats obtenus à des spécifications préétablies.

- **Qualité :**

La qualité, selon l'association française de normalisation (AFNOR), est l'aptitude d'un produit ou d'un service à satisfaire les besoins de l'utilisateur.

Pour obtenir durablement la qualité, il est nécessaire de mettre en place un système d'assurance de la qualité qui définit selon l'AFNOR comme : « la mise en œuvre d'un ensemble approprié de dispositions préétablies et systématiques destinées à donner confiance en l'obtention de la qualité requise » (PARADEAU, 1992).

- **Contrôle microbiologique :**

Les contrôles microbiologiques doivent permettre de garantir une bonne qualité hygiénique et marchande du produit fabriqué, et minimiser les pertes dues aux mauvaises conditions de fabrication (SCRIBAN, 1999).

- **Notion de contamination :**

La connaissance de présence des germes avant stérilisation est importante.

La notion de stérilisation n'est pas absolue mais correspond à une réduction de 10 fois de la quantité des germes présents. De plus, les bactéries elles mêmes peuvent produire des substances éventuellement toxiques à titre d'exemple les amines et les endotoxines.

L'étude de la contamination initiale consiste en un dénombrement bactérien et fongique, il peut inclure aussi un résultat qualitatif par la recherche de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Staphylococcus aureus* ainsi que l'évaluation des endotoxines bactériennes (PRADEAU, 1992).

- **Contrôle de qualité microbiologique des produits pharmaceutiques :**

Le contrôle consiste à mesurer une ou plusieurs caractéristiques d'une entité et à comparer les résultats obtenus à des spécifications préétablies (normes nationales ou

internationales). La qualité ou la propreté microbiologique des produits pharmaceutiques doit répondre aux normes suivantes, toutes en tenant compte de la catégorie à laquelle le produit appartient. (**PHARMACOPEE EUROPÉENNE**).

Catégorie 1 :

Préparations obligatoirement stériles aux termes de la monographie de la forme pharmaceutique correspondante, et aux autres préparations étiquetées stériles. Essai de stérilité.

Catégorie 2 :

Préparation pour application locale ou pour administration dans les vois respiratoires, à l'exception des préparations obligatoirement stériles.

-dénombrement des germes aérobies viables totaux : au maximum 10^2 bactéries, 10^2 moisissures et levures/g ou/ml.

-*Entérobactéries* et certaines autres bactéries à gram négatif. Au maximum 10 bactéries/g ou /ml.

-absence de *Pseudomonas aeruginosa* dans 1g ou 1ml.

-absence de *Staphylococcus aureus* dans 1 g ou ml.

-absence de clostridies dans 1g ou ml

Catégorie3 :

a. Préparations pour administration par voie orale ou rectale :

-dénombrement des germes aérobies viables totaux. Au maximum 10^3 bactéries et 10^2 moisissures et levures/g ou /ml.

-absence d'*Escherichia coli* dans 1g ou 1ml

b. Préparation pour administration orale contenant des matières premières d'origine naturelle :

-dénombrement des germes aérobies viables totaux : au maximum 10^4 bactéries et 10^2 moisissures et levures/g ou/ml.

-*Entérobactéries* et certaines bactéries à gram négatif. Au maximum 10^2 bactéries /g ou/ml.

-absence de *Salmonelles* dans 10g ou 10ml

-absence d'*Escherichia coli* dans 1g ou 1ml

-absence de *Staphylococcus aureus* dans 1g ou 1ml

Catégorie 4 :

Médicaments à base de plantes.

a. Médicaments à base de plantes dont l'emploi fait intervenir de l'eau bouillante :

-dénombrement des germes aérobies viables totaux. Au maximum 10^7 bactéries et 10^5 moisissures et levures/g ou/ml

-au maximum 10^2 *Escherichia coli* /g ou/ml

b. Autres médicaments à base de plantes :

-dénombrement des germes aérobies viables totaux : au maximum 10^5 bactéries et 10^4 moisissures et levures /g ou/ ml

-*Entérobactéries* et certaines autres bactéries à gram négatif. Au maximum 10^3 bactéries /g ou/ml

-absence d'*Escherichia coli* dans 1g ou 1ml

-absence de *Salmonelles* dans 1g ou 1ml.

Etant donné que l'éosine aqueuse, bleu de méthylène, violet de gentiane, eau oxygénée, sont prescrits pour des applications locales, ils sont classés dans la catégorie 2 (PHARMACOPEE EUROPÉENNE).

III.2. Le contrôle de qualité microbiologique des produits pharmaceutiques :

III.2.1. Milieux de cultures :

Généralité :

La plus part des techniques bactériologiques (isolements, identification, conservation, numération des bactéries) exigent l'utilisation de milieu de culture, de plus leur étude est indispensable pour le bactériologiste qui devra :

-choisir les milieux adaptés aux recherches envisagés et aux exigences des bactéries en cause.

-interpréter avec un maximum de précision et d'exactitude les résultats obtenus (MARCHAL *et al.*, 1982)

Milieux de cultures utilisées :

• **L'eau peptonée tamponnée**

Ce milieu, conforme aux normes NF ISO 65795(2002) et NF V 08-052 (1997) est utilisé comme diluant des suspensions mères et comme milieu de pré-enrichissement non sélectif dans la recherche des *Salmonelles* dans les aliments.

Il est également destiné à la dilution des échantillons lors du dénombrement de la flore totale, conformément à la norme NF EN ISO 6887-1 (1999). (Annexe 1)

- **Bouillon nutritif**

Ce milieu assure la croissance des bactéries ne présentant pas d'exigences particulières.

D'après le contrôle de qualité de ce milieu, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Streptococcus pyogenes*...présentent une bonne croissance, après 24heures à 37°C. (DELARRAS, 2007)

- **Bouillon VBL ou BLBVB :**

Le bouillon lactosé bilié au vert brillant avec cloche du Durham, non sélectif, pour la recherche des entérobactéries (dont les coliformes) ou autres bacilles à gram- selon les applications (eaux, aliments, produits non stériles...). (DELARRAS, 2007)

- **Bouillon BCPL :**

Le bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol avec cloche de Durham ou bouillon BCP Lactose, non sélectif, pour la recherche présomptive des coliformes (totaux) et des coliformes thermotolérants en microbiologie des eaux (DELARRAS et TREBAOL, 2003).

- **Gélose Sabouraud :**

La gélose Sabouraud est un milieu recommandé pour la culture des champignons à partir de prélèvements biologiques de toute nature en bactériologie clinique.

La présence de trois peptones et du glucose, ainsi que le pH acide du milieu favorise la croissance des levures et des moisissures (DELARRAS, 2007).

- **Gélose VRBG et la gélose VRBL :**

Les géloses VRBG et VRBL sont des milieux sélectifs d'isolement des entérobactéries et autres bactéries à gram négatif.

La gélose glucosée biliée au cristal violet et rouge neutre est utilisée pour le dénombrement des entérobactéries, dans les produits alimentaires. Alors que la gélose lactosée biliée au cristal violet et rouge neutre est utilisée uniquement pour le dénombrement de certaines entérobactéries(*E.coli*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *entérobacter*)

Les sels biliaires et le cristal violet inhibent les bactéries à gram+.

Les bactéries fermentant le glucose et/ou le lactose libèrent des acides qui font virer le rouge neutre (indicateur de pH) au rouge en milieu acide. Ce dernier est incolore en milieu basique. (DELARRAS, 2007)

- **Gélose Cetrimide :**

La gélose cetrimide permet la recherche et l'isolement sélectif de *Pseudomonas aeruginosa* (bacille pyocyanique) à partir de produits biologiques (selles, urines, pus, liquide céphalorachidien...) en bactériologie médicale.

Elle est utilisée aussi en contrôle microbiologique des produits pharmaceutiques non obligatoirement stériles.

Le cetrimide est un antiseptique (ammonium quaternaire) inhibiteur de beaucoup de germes autre que les *P.aeruginosa*.

La peptone de gélatine est une peptone trypsique de gélatine, à faible teneur en cystéine, tryptophane et hydrates de carbone.

Le sulfate de potassium et le chlorure de magnésium favorisent la production des deux pigments (pyocyanine et pyoverdine) (DELARRAS, 2007).

- **Gélose Chapman :**

La gélose Chapman est un milieu de culture ancien (Chapman, 1945), destiné à l'isolement et à la différenciation des Staphylocoques.

Ce milieu est utilisé :

-pour l'isolement des staphylocoques à partir de prélèvements biologiques en bactériologie médicale ;

-pour la détection de *staphylococcus aureus* dans les eaux de piscines en appliquant la norme NF T 90-421 relative aux examens bactériologiques des eaux de piscines ;

-pour le contrôle microbiologique des produits pharmaceutiques non obligatoirement stériles, conformément aux exigences de la pharmacopée américaine et européenne.

Le chlorure de sodium à concentration élevée (75g/l) inhibe de nombreux germes, sauf les germes halophiles ou halotolérants.

Certaines souches de staphylocoques peuvent être partiellement inhibées par le chlorure de sodium.

La fermentation du mannitol (polyalcool) par certaines espèces de staphylocoques, libère les acides qui font virer le rouge de phénol au jaune en milieu acide ; dans le cas contraire, le milieu conserve sa couleur rouge initiale (DELARRAS, 2007).

III.2.2. Les microorganismes recherchés :

1. Les levures et les moisissures :

- **Les levures :**

D'après JOFFIN *et al* (2001), il est difficile de donner une définition simple et précise du terme « levures ». Ce dernier recouvre un groupe hétérogène de champignons

microscopiques, à un stade de leur cycle biologique, se présentant sous une forme unicellulaire. La plupart de ces microorganismes se multiplient par bourgeonnement, ou par scissiparité, pour certains. En effet ce groupe comporte 60 genres et 500 espèces.

- **Les moisissures :**

Les moisissures ne correspondent pas à un groupe systématique homogène. Ils se situent dans diverses familles de champignons microscopique comme les levures, ce sont des « micromycète » saprophytes, se développent au dépend des substances inertes ou en voie de décomposition. Ces microorganismes possèdent un appareil végétatif constitué par un thalle filamenteux « le mycélium », dont les filaments s'appellent « des hyphes » (BOURGEOIS *et al*, 1990).

Selon JOFFIN *et al* (2001), les milieux d'isolements des champignons sont constitués d'une gélose sabouraud (peptone glucosée) additionnée de chloramphénicol ou de gentamycine, ou d'un mélange de ces différents antibiotiques.

- **Les entérobactéries et E. coli:**

1. **Les entérobactéries :**

Souvent rencontrés dans le sol et les eaux, ce sont des commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux. Ils sont rarement pathogènes, et peuvent exceptionnellement se révéler comme agent de pleurésies, méningites ou pyélonéphrites, ce sont des entérobactéries mobiles capsulées ou non, sur gélose les colonies sont brillantes, opaques, d'aspect assez gras (PILET *et al.*, 1979)

2. ***E. coli* :**

C'est une bacille à gram négatif, appartenant à la famille des *Entérobacteriaceae*, elle se développe sur gélose ordinaire et produit habituellement de l'indole. Elle fermente également le lactose, mais ne produit pas d'acétone. Nous avons à titre d'exemple un milieu d'isolement pour les entérobactéries, c'est le VRBL (PILET *et al.*, 1979).

- ***Staphylococcus aureus* :**

le germe ***Staphylococcus aureus*** appartient à la famille de Micrococcaceae qui regroupe des espèces bactériennes constituées de cellules arrondies (cocci) à gram positif. Ces microorganismes sont immobiles, disposées en amas, à la façon d'une grappe de raisin ; produisant une catalase, et ils sont aéro-anaerobies, dont l'espèce *Staphylococcus aureus* produit une coagulase (enzyme capable de coaguler le plasma de lapin oxalaté), et responsable d'infection pyogènes graves. C'est une espèce saprophyte ou commensale. (FAUCHER *et al*, 2002)

Pour l'isolement sélectif des Staphylococcus, deux milieux sont utilisés : le milieu de Chapman et le milieu Baird Parker (JOFFIN *et al.*, 2001).

- ***Pseudomonas aeruginosa* :**

Pseudomonas aeruginosa Ou bacille pyocyanique est une bactérie saprophyte de l'air et du sol, commensale des téguments et des muqueuses de l'homme. Elle peut avoir un pouvoir pathogène étendu. Ces caractères généraux se résument comme suit : c'est un bacille à gram négatif aérobie stricte, et à oxydase positive. Elle est mobile par un flagelle polaire dont la température optimale de sa croissance est de 30°C (PILET *et al.*, 1979; FAUCHERE *et al.*,2002).

- **Clostridia de la gangrène gazeuse :**

La gangrène gazeuse est une infection grave consécutive à l'introduction dans une plaie de terre ou de matières fécales souillées de spores de Clostridium. Le principal *Clostridium* qui provoque la gangrène gazeuse est *C.perfringens* bacterie a gram positif sporulé (CHU DE PITIE, 2003).

Habitat de Clostridium perfringens

C.perfringens est présent dans le sol, dans le tube digestif de l'homme et des animaux. On le trouve dans les voies génitales féminines dans 5 % des cas. (CHU DE PITIE, 2003).

Pouvoir pathogène naturel de C.perfringens

A partir d'une plaie souillée par la terre (par exemple fracture ouverte), l'infection s'étend en 1 à 3 jours. Elle réalise :

— la gangrène gazeuse qui se manifeste comme un phlegmon gazeux avec crépitation et nécrose

progressive, fièvre, hémolyse, syndrome toxique, choc, puis la mort survient rapidement.

Avant l'apparition des antibiotiques, l'amputation était le seul traitement possible ;

— des appendicites, des entérites gangréneuses ;

— des syndromes septicémiques d'origine puerpérale avec ictère hémolytique et anurie.

Par ailleurs, certaines souches de *C.perfringens* provoquent des intoxications alimentaires avec diarrhée profuse qui durent de 1 à 3 jours, par un mécanisme similaire à celui de l'entérotoxine de *E.coli*. (CHU DE PITIE, 2003).

Caractères bactériologiques de C.perfringens

C.perfringens se distingue des autres Clostridia par son *immobilité* et l'existence d'une *capsule*.

En culture, il est fortement hémolytique et produit une quantité importante de gaz par fermentation (gangrène gazeuse !). Il secrète une exotoxine protéique qui est une phospholipase (lécithinase) qui désorganise les membranes cellulaires, en particulier musculaires. Cette toxine est aussi une hémolysine. Elle est antigénique. *C.perfringens* secrète également une désoxyribonucléase (DNase), une hyaluronidase et une collagénase dont l'action favorise l'extension de l'infection à *C.perfringens*. Enfin, certaines souches, responsables d'intoxication alimentaire, secrètent une entérotoxine, thermolabile, voisine de l'entérotoxine d'*E.coli*. (CHU DE PITIE, 2003).

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes :

1. Présentation de lieu de stage :

Ce travail de contrôle de qualité microbiologique a été réalisé au sein du laboratoire de contrôle de qualité alimentaire à Blida durant 5 mois en 2013.

Notre enquête consistait à faire des prélèvements de 4 différents produits non obligatoirement stérile « éosine aqueuse, bleu de méthylène, eau oxygénée, violet de gentiane » de façon aléatoire de différentes officines établies sur 5 wilayas : Alger ; Blida ; Constantine ; Msila et Oran, dans un but de faire un contrôle de qualité microbiologique.

1.1. Matériels :

Au niveau du laboratoire de contrôle de qualité il a été mis à notre disposition tout le matériel nécessaire pour effectuer nos contrôles microbiologiques. (**Annexe I**)

1.2. Échantillonnage :

Le prélèvement est une opération préliminaire pour le contrôle d'un produit pharmaceutique, il faut le faire correctement pour avoir des analyses et des résultats fiables et représentatifs.

On a acheté 100 flacons composés de 32 flacons d'éosine aqueuse, 30 flacons de bleu de méthylène, 08 flacons de violet de gentiane et 30 flacons d'eau oxygénée provenant de 19 fabricants différents. Ces flacons commercialisés ont été prélevés de façon aléatoire dans différentes pharmacies provenant de 5 wilayas, les flacons sont en PVC dans la majorité du temps avec un bouchon non serti à l'exception de quelques uns. Les étiquettes mentionnent une aberration flagrante que la solution est une solution antiseptique ou une solution pour désinfecter, alors que l'éosine aqueuse n'est pas un antiseptique mais un asséchant.

Le **tableau IV** regroupe les 100 échantillons provenant des 05 wilayas:

Tableau IV : Nature, mode et dates de prélèvement.

Lieu de prélèvement	Nombre de prélèvement	Nature de prélèvement				Date de prélèvement	Contrôle effectué
		éosine aqueuse	bleu de méthylène	violet de gentiane	eau oxygénée		
Pharmacie d'Alger	40	12	12	04	12	24 /05/2013	microbiologique
Pharmacie de Blida	18	06	06	02	02	21 /03/2013	
Pharmacie de Constantine	24	08	08	0	08	18/04/2013	
Pharmacie de Oran	10	04	02	0	04	21 /04/2013	
Pharmacie de Msila	10	02	02	02	04	22 /05/2013	
Total	100	32	30	08	30	/	

1.3. Analyse microbiologique selon la pharmacopée Européenne :

Le choix de la méthodologie de contrôle microbiologique qui est basé sur la pharmacopée européenne 7^{ème} édition, catégorie 2 prescrit à la préparation à usage locale la recherche et le dénombrement des microorganismes suivants :

- germes viables totaux « bactéries, levures et moisissures » et Entérobactéries.

Et la recherche de :

- *Pseudomonas aeruginosa*.
- *Staphylococcus aureus*.
- Entérobactéries.
- Clostridium

La méthode d'analyse utilisée est réalisée selon les étapes suivantes :

1.3.1. Dénombrement des germes viables totaux :

1.3.1.1. Préparation de l'échantillon :

Les dilutions pour analyses microbiologiques sont préparées à partir des flacons de produit de 60ml, un volume de 10ml de produit sont diluées dans 90 ml de solution tampon péptonée au chlorure de sodium avec tween 80 à pH =7

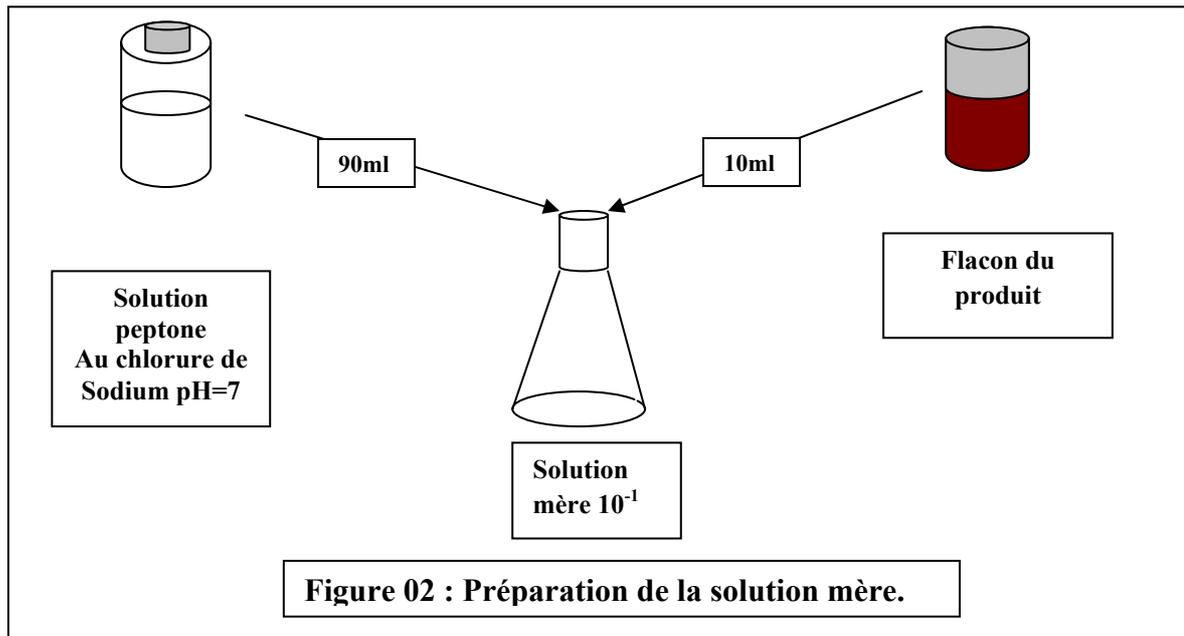
Cette préparation a été effectuée selon la méthode suivante :

- Dépôt de l'échantillon et du matériel auprès du bec benzène.

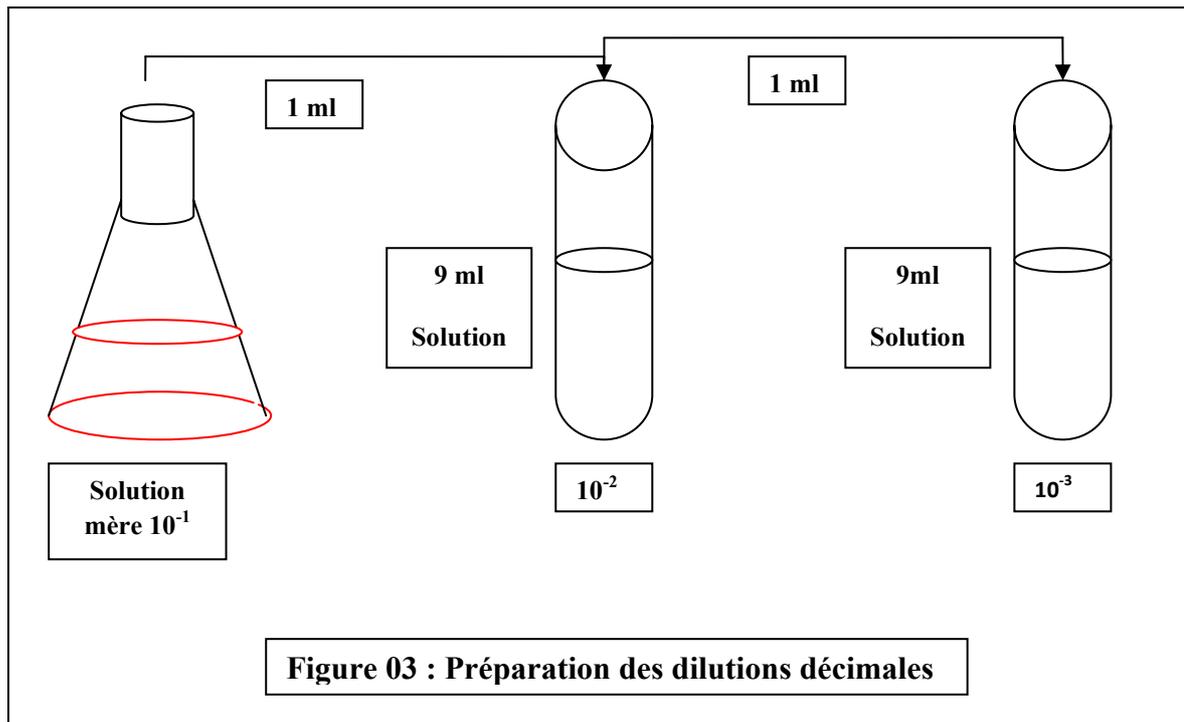
- pipetage 10 ml de l'éosine aqueuse dans des conditions qui permettent d'éviter tout risque de contamination accidentelle au cours de l'essai.
- rajout de 90ml de solution tampon peptonée au chlorure de sodium avec tween 80 à pH=7.

La dilution ainsi préparée correspond à la solution mère de concentration 10^{-1} .

(Figure 02)



La solution de concentration 10^{-2} est préparée par dilution 1ml de la solution 10^{-1} dans 9ml de solution tampon et ainsi de suite pour les préparations de dilutions inférieure. **(Figure 03)**



1.3.1.2. Dénombrement sur plaque de gélose

Cet examen vise à dénombrer non spécifiquement le plus grand nombre de microorganismes ; mais particulièrement ceux qui se développent dans des conditions habituelles de culture.

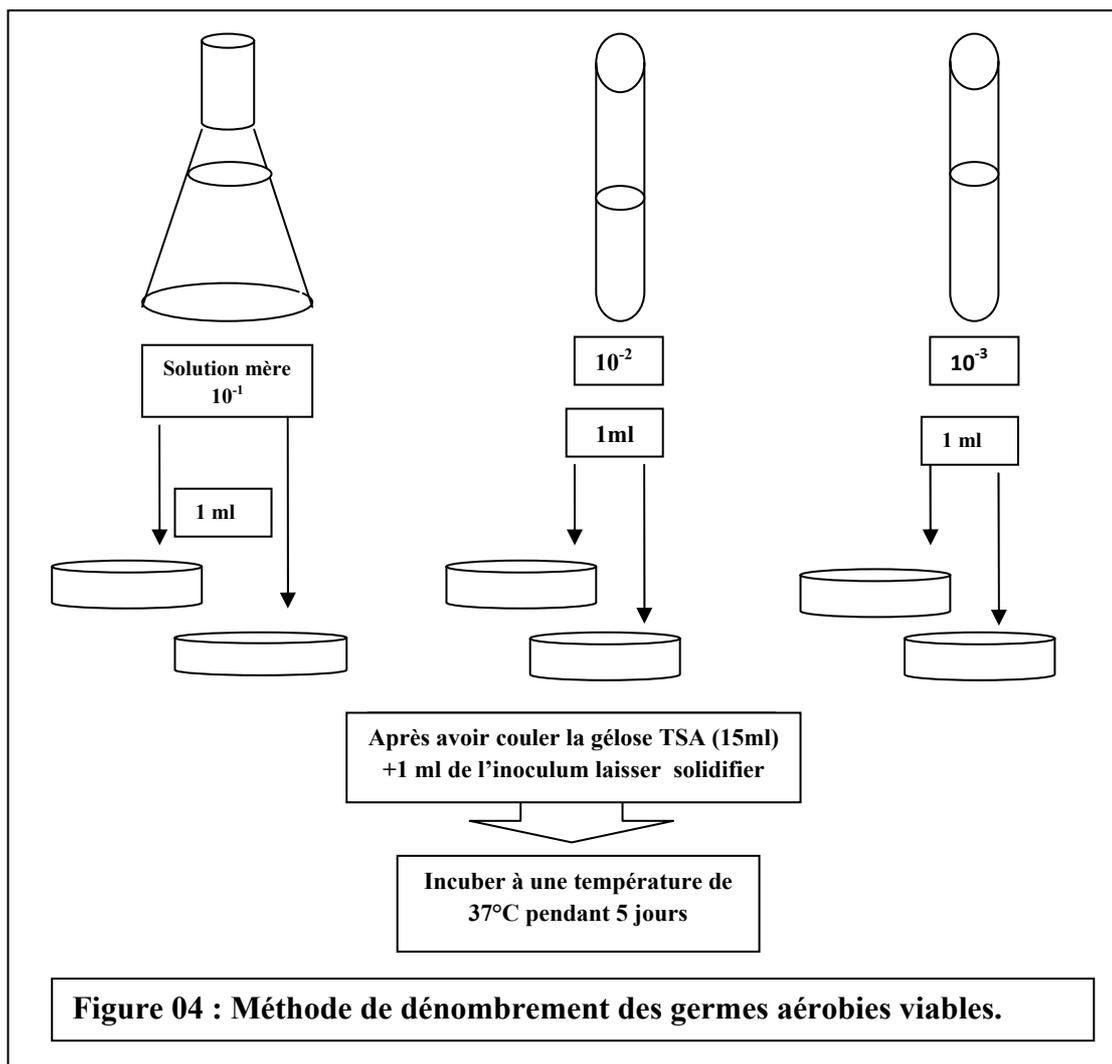
Le dénombrement de ces germes est utilisé comme indicateur de pollution. Il est déterminé par ensemencement en profondeur sur une plaque.

1.3.1.2.1. Dénombrement des germes aérobies viables totaux :

Pour chaque dilution, on a utilisé deux boites pétri de la manier suivante :

- a partir de chaque dilution 1ml est prélevé et introduit dans chaque boite de pétri.
- Puis on verse 15ml de milieu gélosé TSA liquéfié dans les boites de pétri.
- On agit avec des mouvements circulatoires en forme de 8 permettant ainsi a l'inoculum de s'homogénéiser avec la gélose.
- Laisser la gélose se solidifier.
- Incuber les boites de pétri à 35°C-37°C pendant 5 jours, couvercle vers le bas.

Les étapes essentielles à ce dénombrement sont représentées dans la **figure n° 04** :



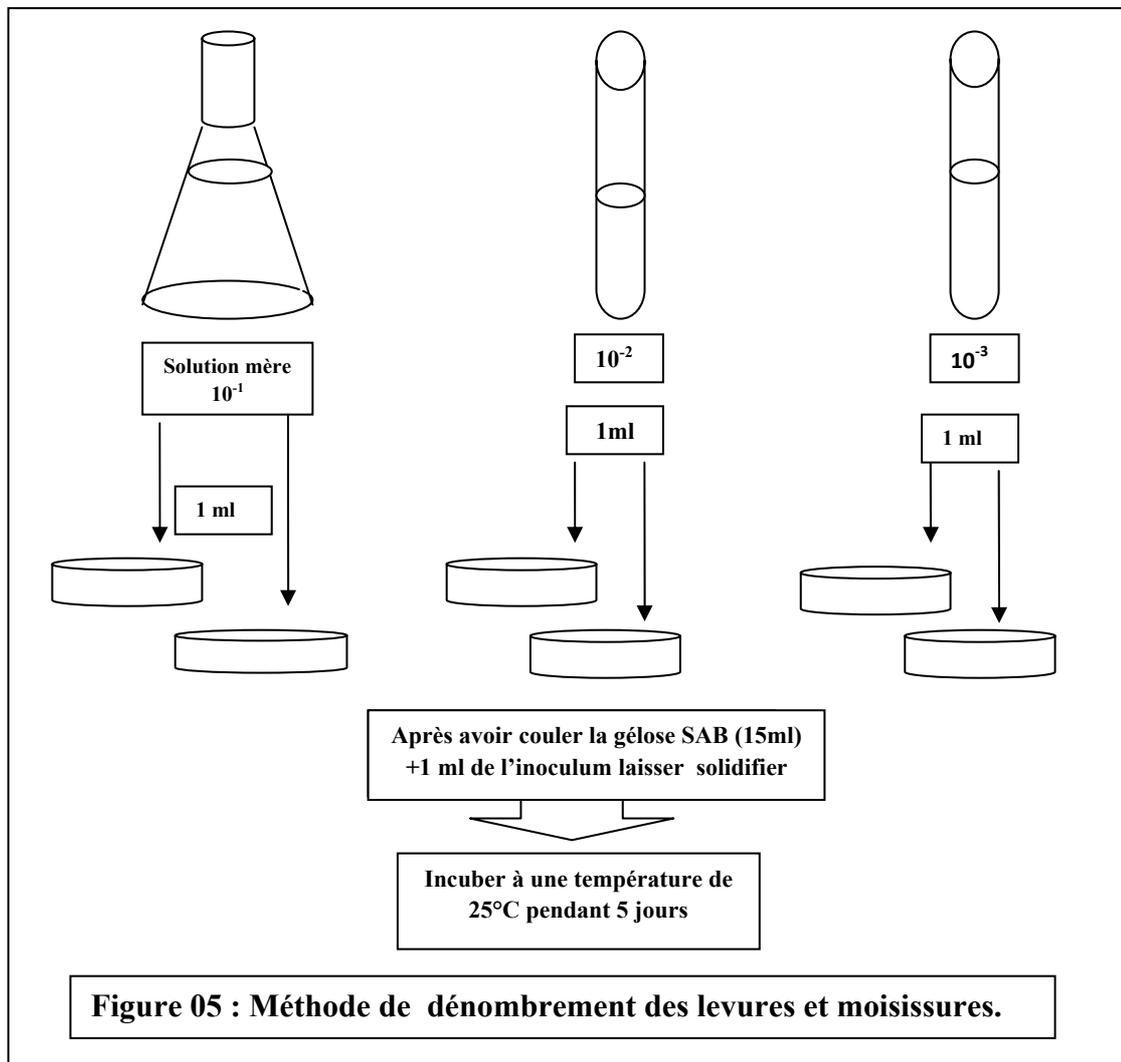
1.3.1.2.2. Dénombrement des levures et des moisissures :

Pour le dénombrement des levures et des moisissures nous avons procédé de la même manière que pour le dénombrement des bactéries aérobies viables totaux, la différence réside dans l'utilisation d'un autre milieu qui est le milieu Sabouraud glucosé gélosé+chloramphénicol. Et l'incubation des boites à 25°C pendant 5 jours.

La lecture consiste à dénombrer les colonies qui se sont développées, nous avons utilisé les boites qui représentent le plus grand nombre de colonies en considérant que 100 colonies représentant le maximum.

Le calcul des résultats se fait selon la même formule utilisée pour les bactéries aérobies viables totaux.

Les méthodes de prélèvement et d'ensemencement sont présentées dans la **figure 05** :



1.3.1.3 Lecture des résultats :

La lecture des résultats sera faite par le dénombrement des colonies développées, pour les trois dilutions, en considérant que 100 colonies représentent le maximum

Le calcul se fait selon la formule suivante :

$$N = X \times 1/V \times 1/D$$

N : nombre de bactéries par millilitre

X : nombre de colonies comptées

V : volume de l'inoculum prélevé à partir de la solution mère

D : la dilution

1.3.2. Recherche des germes spécifiés :

*L'enrichissement :

C'est une étape commune pour la recherche des germes, elle se fait comme suit :

- prélèvement de 10 ml à partir de la solution mère.
- puis l'ensemencement dans 10ml d'un bouillon nutritif.
- L'incubation se fait pendant 18^h ou 24^h à une température de 37°C.

a) *Pseudomonas aeruginosa* :

- prélèvement de 1ml du bouillon nutritif de 24^h d'incubation.
- puis l'étaler grâce à une pipette en forme de râteau sur le milieu gélose Cetrimide.
- aspiration du surplus à l'aide d'une pipette
- L'incubation se fait à 37°C pendant 24^h.

Remarque :

L'apparition des colonies verdâtre et fluorescentes, odeur spécifique, la confirmation se fait par : mobilité polaire, oxydase (+), Gram (-), caractères biochimiques

b) *Staphylococcus aureus* :

- On a prélevé 1ml du bouillon nutritif 24^h d'incubation.
- Puis on l'étale grâce à une pipette en forme de râteau sur le milieu gélose Chapman.
- Aspiration de surplus à l'aide d'une pipette.
- L'incubation se fait à 37°C pendant 24^h.

L'apparition de colonies blanches avec pourtour jaune, Mannitol positif, le Gram (+) et la catalase (+) peut orientent vers la présence des Staphylococcaceae, le test coagulase(+) pour la confirme l'espèce de Staphylococcus aureus.

c) *Entérobactéries* :

- prélèvement de 1ml du bouillon nutritif 24^h d'incubation.
- puis on l'étale grâce à une pipette en forme de râteau sur le milieu gélose VRBG.
- aspiration du surplus à l'aide d'une pipette. L'incubation se fait à 37°C pendant 24^h.

*lecture :

Consiste en l'étude macroscopique au cours de laquelle nous citerons les caractères cultureux des colonies qui sont : taille, couleur, aspect, contour, des colonies croissantes après 24^h à 37° d'incubation.

- Bactéries a Gram(-), oxydase(-), confirmation par api20E.

La **figure 06** décrit cette détermination :

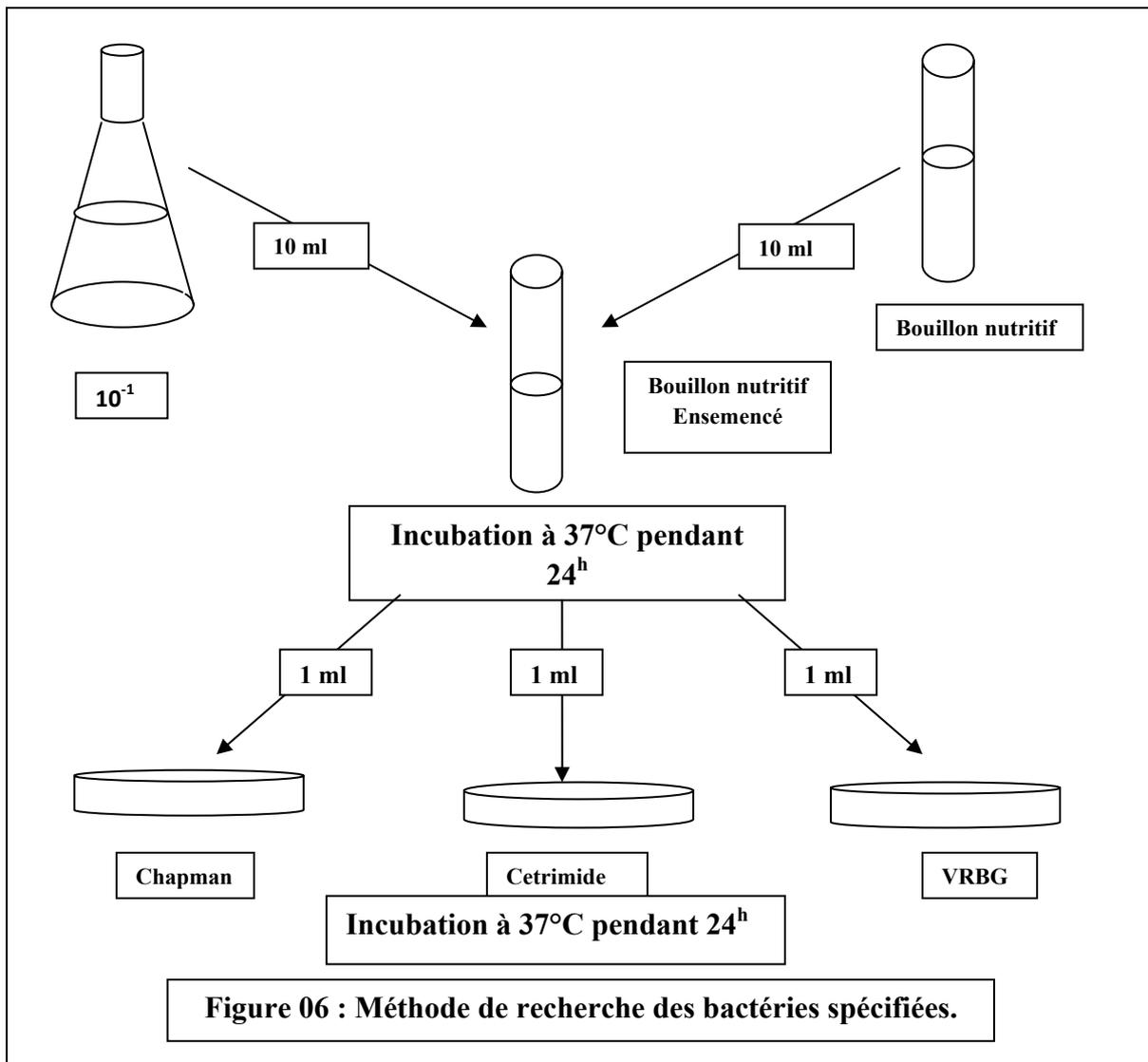


Figure 06 : Méthode de recherche des bactéries spécifiées.

d) Recherche des Clostridies :

- Prélèvement de 1ml de la solution mère et la mère dans un tube en verre stérile.
- puis le chauffé a 80°C pendant 10min, après le refroidir rapidement.
- Ajouter la gélosé viande-foie+ additif.
- L'incubation se fait en anaérobiose à 37°C pendant 48H.

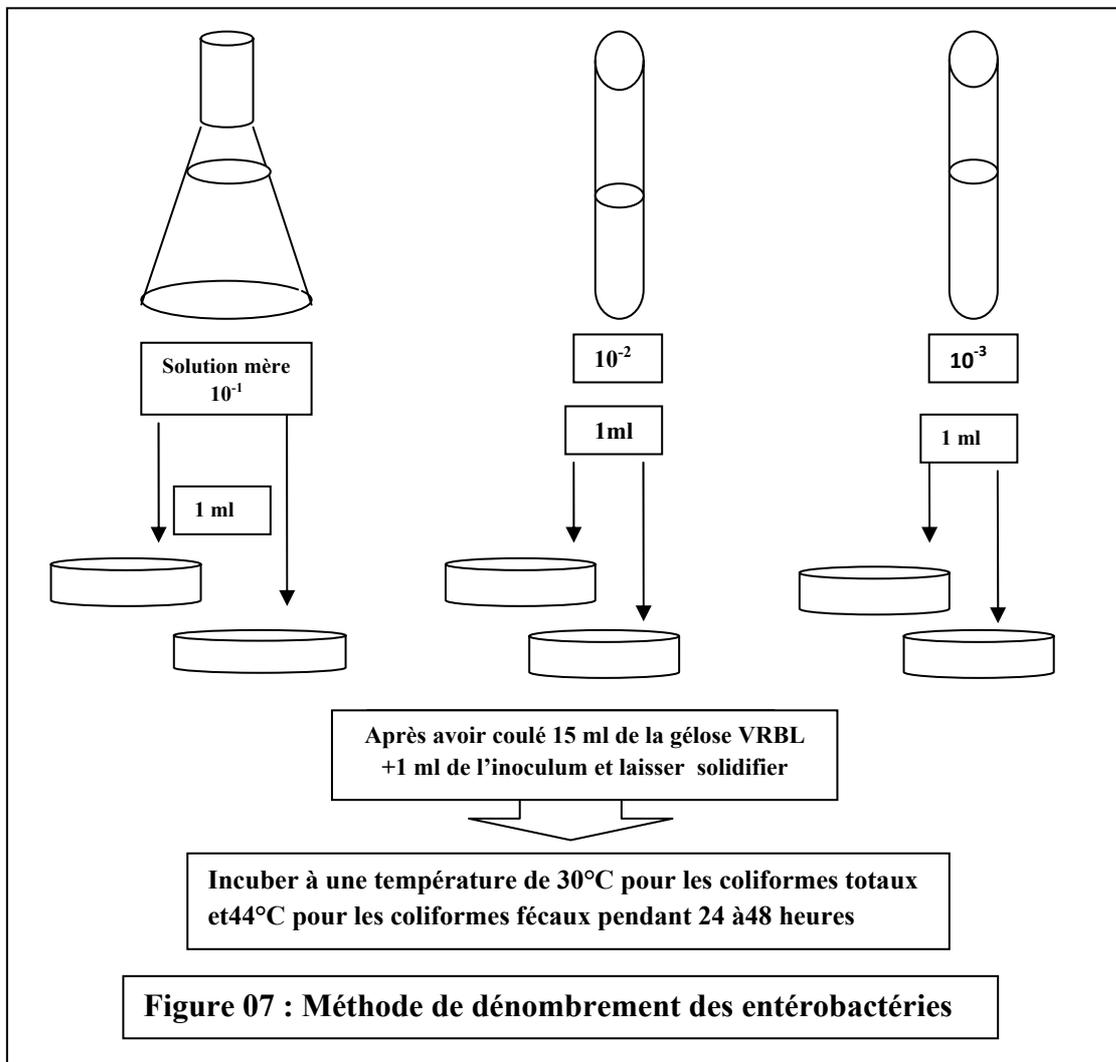
La croissance anaérobie des colonies noir, Gram(+), morphologie bâtonnets (avec ou sans endospores) donnant une réaction catalase négative indique la présence de clostridies.

e) Dénombrement des entérobactéries :

Nous avons procédé de la même manière que pour le dénombrement des bactéries aérobies viables totaux, la différence réside dans l'utilisation d'un autre milieu qui est le milieu VRBL; et l'incubation des boîtes est à 30°C pendant 24 à 48 heures pour les coliformes totaux et à 44°C pendant 24 à 48 heures pour les coliformes fécaux.

La lecture consiste à dénombrer les colonies qui se sont développées, nous avons utilisé les boîtes qui représentent le plus grand nombre de colonies en considérant que 10 colonies représentant le maximum. Le calcul des résultats se fait selon la même formule utilisée pour les bactéries aérobies viables totaux.

La méthode de dénombrement des entérobactéries est représentée schématiquement dans la **figure n° 07**.



1.4. Identification des germes isolés :

1.4.1 Isolement et Purification :

Isolement :

On a fait l'isolement des germes spécifique sur des milieux sélectifs.

Purification :

La purification des pseudomonas on a été faite selon la procédure suivante :

-Prélever une colonie de la boîte de cetrimide puis l'ensemencer dans un milieu TSI l'incuber pendant 24 heures a 37°C.

-reprendre une colonie depuis le milieu TSI et l'ensemencer dans une gélose nutritive incliné puis l'incuber a 37°C pendant 24 heures.

Avec le contact de l'air les colonies des Pseudomonas deviennent verdâtre; a partir de cette culture pure nous effectuons une identification.

1.4.2. Etude microscopique :

Nous avons pu observer grâce a un état frais des bactéries vivantes au (Gx40x10) ou mortes fixées sur une lame et colorées par la coloration de Gram au (Gx100x10), à l'aide d'un microscope optique à fond clair.

1.4.3. Examens à l'état frais :

Il permet l'observation des bactéries vivantes et la détermination de leur morphologie, de leur mode de regroupement, de leur mobilité éventuelle.

- **Technique :**

-Prise d'une lame propre nettoyée avec un coton imbibé d'alcool à 95%

- une goutte d'eau physiologique stérile est déposée sur la lame.

- Nous avons apporté dans l'eau un inoculum bactérien.

- La lame est recouverte par une lamelle.

-L'observation se fait avec le microscope optique à l'objectif x 40.

Il faut régler convenablement la lumière et ne pas prolonger le temps d'observation au-delà de 3 minutes, sinon la préparation se dessèche.

1.4.4. Examen après coloration sur frottis :

L'examen de bactéries fixées et colorées par la coloration de Gram, permet de mieux observer les détails morphologiques des cellules bactériennes: agencement, taille, Gram positif ou négatif.

- **Techniques de coloration de GRAM:**

Sur frottis fixé à la chaleur

- Nous avons recouvert la lame par le violet de gentiane durant 1 minute
- Puis rejeter le violet de gentiane.
- On recouvert le lugol puis on le laisse agir pendant 30secondes.
- Puis on le rejette et on le rince une autre fois à l'eau distillée.
- Décolorer A l'Acétone, la lame était tenue inclinée .La durée de décoloration est de 10 secondes, arrêter la décoloration par rinçage avec de l'eau.
- Recolorer avec de la fuchsine pendant une minute.
- Puis rincer à l'eau.
- Entre deux feuilles de papier filtre, on sèche la lame.

L'observation au microscope se fait à l'objectif x100 à immersion.

Avec cette coloration double, les bactéries gram+ apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries à gram- sont colorées en rose.

1.4.5. Recherche de l'oxydase- teste oxydase

L'oxydase ou Cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires cytochromiques bactériennes.

- **Technique :**

- Nous avons déposé sur une lame porte-objet propre, un disque « Ox » et l'imbiber avec une goutte d'eau distillée ou d'eau physiologique stérile.
- Prélèvement d'une partie de la colonie à étudier à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée stérile que nous lavons étalé sur le disque.

Une coloration violet foncé apparaît immédiatement sur le disque ou en quelque secondes puis vire au noir : teste oxydase+

1.4.6. L'identification par la Galeries API :

- **Présentations de la galerie :**

API 20 E est un système standardisé, conçu dans les années 1970 permettant d'identifier aujourd'hui :

- 21 genres d'entérobactéries, répartis en 70 espèces, sous espèces ou biotypes ;
- 18 autres genres de bacilles g- dont les Pseudomonas

L'API 20 E c'est une méthode qui nous a permis de mettre en évidence les Pseudomonas .

- **Compositions de la galerie :**

La galerie API 20 E est composée de 20 micros tubes surmontés de cupules

Les microtubules contenant des substrats déshydratés, qui permettent de réaliser 21 tests biochimiques du métabolisme respiratoire, glucidique et protéique

Le teste oxydase constitue le 21^e test d'identification à effectuer hors galerie.

- **Préparation, inoculation et incubation de la galerie :**

A partir d'une culture pure, préparer une suspension bactérienne homogène dans une ampoule d'API. Un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile peut être utilisé pour préparer la suspension

Créer un endroit humide par l'ajout d'eau distillée dans la galerie

Inoculer la galerie suivant le mode opératoire du fabricant, en notant que :

-pour les tests CIT, VP, GEL, les tubes et les cupules doivent être remplis avec la suspension bactérienne ;

-pour les tests ADH, LDC, ODC, H₂S et URE, les cupules sont remplies d'huile de paraffine afin d'obtenir une anaérobiose.

Incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures.

*Après l'incubation nous avons appliqué les tests nécessitant l'addition de réactifs comme suit :

-**VP** : ajouter une goutte des deux réactifs NIT1 et NIT2 et attendre 5 minutes.

-**GLU** : ajouter de Zinc et attendre 5 minutes.

-**TDA** : ajouter une goutte de chlorure ferrique et lire immédiatement.

-**IND** : ajouter une goutte du réactif de Kovac et lire immédiatement.

Lecture :

Après incubation, lire les réactions en appliquant le tableau de lecture principal (**annexe II**)

Deux cas se présentent :

-si trois tests ou plus (testes GLU+ ou -) sont positifs, relever sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs ;

-si le nombre de tests positifs avant ajout des réactifs (y compris le teste glucose) est inférieure à 3, incuber à nouveau la galerie 24^h sans rajouter de réactif. Puis réaliser les tests complémentaires.

1.4.7. L'antibiogramme :

L'antibiogramme est une méthode utilisant un milieu gélosé spécifique en boîtes de pétri et des disques imprégnés d'antibiotiques à des concentrations déterminées. La gélose Mueller Hinton est le milieu utilisé en générale.

Cette méthode permet d'évaluer la sensibilité d'une bactérie pathogène vis-à-vis d'antibiotique choisis en fonction des indications clinique fournies et de la prévalence de la résistance acquise.

En mesurant les diamètres des zones d'inhibition autour des disques d'antibiotiques et en consultant les tableaux « de concentrations, diamètres critiques et règle de lecture interprétative » pour une espèce bactérienne donnée, nous pouvons savoir si, pour les antibiotiques testés, une souche bactérienne est sensible, intermédiaire ou résistante. La mesure du diamètre d'inhibition représente la valeur de la CMI de l'antibiotique.

Technique :

-A partir d'une culture pure de 18 à 24heures sur milieu d'isolement, racler quelques colonies bien isoler et parfaitement identiques.

-Décharger l'anse dans 10 ml d'eau physiologiques stérile a 9‰.

-Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 MC Ferland.

-L'inoculum peut être ajuste en ajoutant soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique s'il est trop fort.

Ensuite l'ensemencer par inondation dans le milieu Mueller-Hinton gélosé (épaisseur 4mm) puis laisser sécher sur la paillasse pendant 15minutes ; ensuite nous avons appliqué les disques d'antibiotiques à l'aide d'une pince sur ce milieu.

L'incubation de la gélose Mueller-Hinton va durer 18heures a 37°C couvercle en dessous.

Lecture :

Après 24h d'incubation :

On Mesure les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'une règle à l'extérieur de la boîte fermée, et nous avons Comparé ses résultats avec les valeurs critiques figurant dans le tableau de culture. **(Voir annexe III)**

- En fonction de la sensibilité, la bactérie est classé dans l'une des catégories : sensible, intermédiaire ou résistante.

Remarque :

Le choix des antibiotiques s'est fait selon des données bibliographiques et en fonction de la 6^{eme} édition de standardisation des antibiotiques utilisés pour la recherche de la sensibilité ou la résistance des Pseudomonas (**OMS, 2011**), qui sont les suivants : Ticarcilline ; Ticarcilline+acide clavulanic ; Pipèracilline ; Ceftazidime ; Imipèneme ; Aztréonam ; Gentamicine ; Amicacine ; Tobramycine ; Ciprofloxacine ; colistine sulfate ; cefotaxime.

Résultat et discussion

I. Résultats du contrôle de pureté microbiologique :

Au total d'un ensemble de 100 Lots composés de 32 flacons d'éosine aqueuse, 30 flacons de bleu de méthylène, 08 flacons de violet de gentiane et 30 flacons d'eau oxygénée, soumis aux essais de contrôle microbiologique, prélevés de façon aléatoire de 5 wilaya (Alger, Blida, Constantine, Oran, Msila).

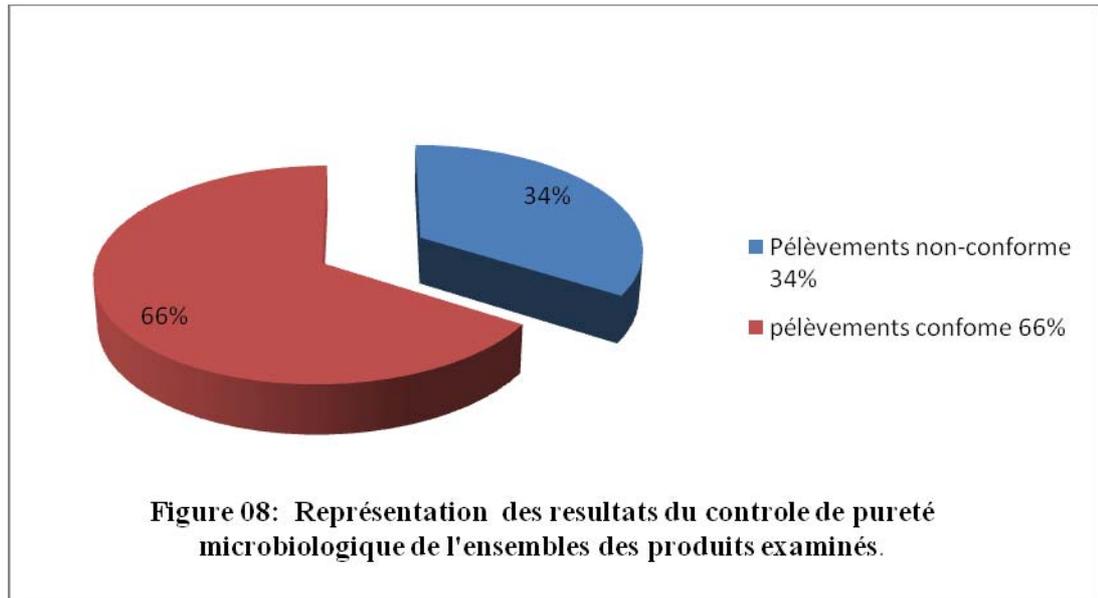
Les résultats sont regroupés en chiffres et en pourcentages dans le **tableau V**.

Tableau V : Résultat du contrôle de pureté microbiologique des 100 lots de l'ensemble des produits contrôlés.

Origine de prélèvements	Nombre de prélèvement	Type de prélèvements				Prélèvement conformes	Prélèvement non conformes
		éosine aqueuse	bleu de méthylène	violet de gentiane	eau oxygénée		
Alger	40	12	12	04	12	26 /40 (65%)	14/40 (35%)
Blida	16	06	06	02	02	08/16 (50%)	08/16 (50%)
Constantine	24	08	08	0	08	18/24 (75%)	06/24 (25%)
Oran	10	04	02	0	04	06/10 (60%)	04/10 (40%)
Msila	10	02	02	02	04	06/10 (60%)	04/10 (40%)
Prélèvement conformes/ type de produit	/	04/32 (12,5%)	26/30 (86,67%)	06/08 (75%)	30/30 (100%)	66 (66%)	
Prélèvement non conformes / type de produit	/	28/32 (87,5%)	04/40 (13,33%)	02/08 (25%)	0/30 (0%)		34 (34%)

Nous constatons dans le **tableau V** que sur les 100 échantillons soumis au contrôle microbiologique : 34 échantillons (34%) sont non conformes, et 66 échantillons (66%) sont conformes. Sur les 34% des produits non conformes on remarque que la totalité des échantillons d'eau oxygénée sont conformes.

Ces résultats sont représentés sous forme d'un diagramme en secteurs (**Figure 08**).



II. Interprétation et la répartition des résultats du contrôle de pureté :

II.1. Répartition des résultats de non-conformité :

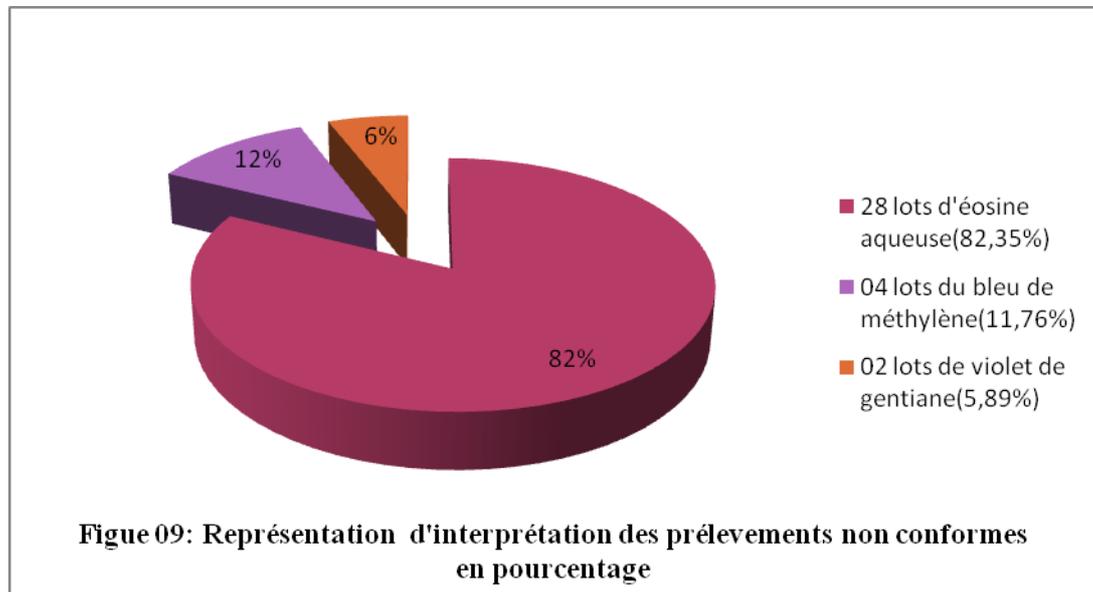
Sur les 34 échantillons non conformes, on a trouvé :- 28 échantillons d'éosine aqueuse, 4 échantillons de bleu de méthylène et 2 échantillons de violet de gentiane, représentant respectueusement en pourcentage : 82,35% ; 11,76% ; 5,89%.

Ces résultats de non-conformité sont regroupés dans le **tableau n° VI**

Tableau VI : La répartition des résultats du contrôle de pureté microbiologique des 34 lots non conformes.

Origine de prélèvements	Nombre de prélèvement Non conformes	Prélèvement non conformes			
		éosine aqueuse	bleu de méthylène	Violet de gentiane	Eau oxygénée
Alger	14	10	02	02	0
Blida	08	06	02	0	0
Constantine	06	06	0	0	0
Oran	04	04	0	0	0
Msila	02	02	0	0	0
total	34	28 (82,35%)	04 (11,76%)	02 (5,89%)	0 (0%)

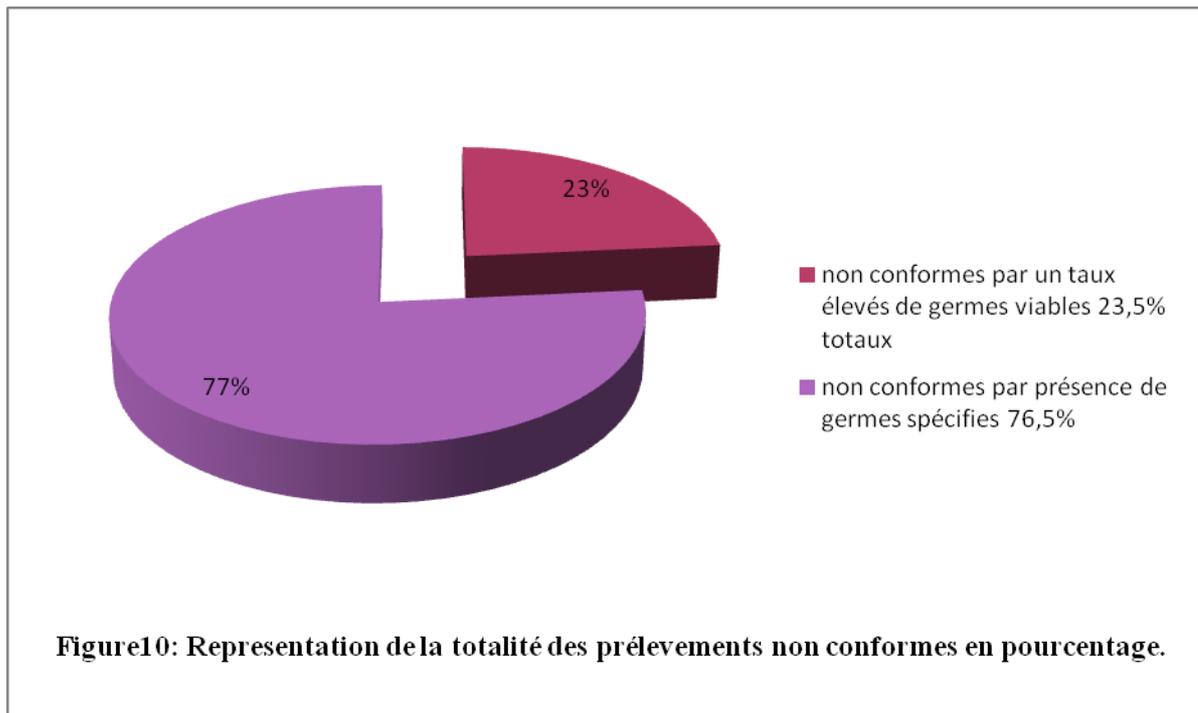
Les résultats du **tableau V** sont représentés sous forme d'un schéma (**Figure 09**):



Nous constatons dans la **figure n° 09** la nette prédominance de non-conformité de l'éosine aqueuse dans les 05 wilayas.

II.2. Interprétation des résultats du contrôle de pureté par produit :

Sur les 34 échantillons non conformes, 08 échantillons (23,5%) sont non conformes par un taux élevés de germes viables totaux et 26 échantillons (76,5%) sont non conformes par présence de germes spécifiques. Ces résultats sont représentés sous forme d'un secteur (**Figure10**):



L'interprétation de ces résultats permet de mettre en évidence une prédominance de non-conformité due à la présence de germes spécifiques (76,5%)

II.2.1. Bleu de méthylène :

Sur les 30 échantillons prélevés de bleu de méthylène prélevés, 26 échantillons sont conformes et 4 échantillons sont non conformes :

- 02 échantillons sont prélevés dans la wilaya de Blida ; leurs non conformités est due à la présence de germe spécifiques (*Pseudomonas fluorescens*).
- 02 échantillons sont prélevés dans wilaya la d'Alger ; leurs non conformités est due à un taux élevé de germes mésophiles totaux.

II.2.2. Violet de gentiane :

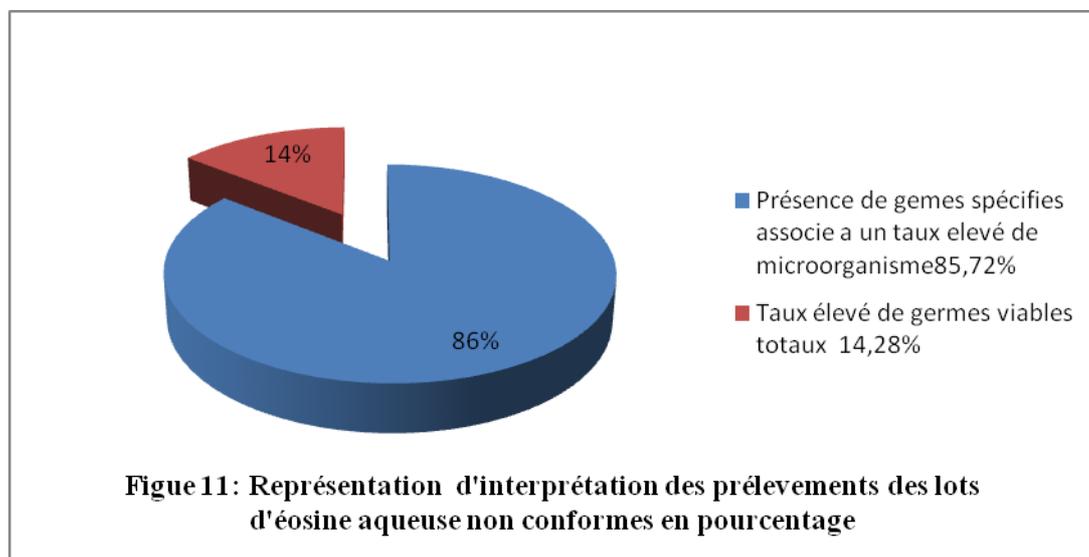
Sur les 08 échantillons de violet de gentiane, 02 sont non conformes par un taux élevé de microorganismes (levure et moisissure et GMT), ces derniers ont été prélevés dans la wilaya d'Alger.

II.2.3. Eosine aqueuse :

Sur les 32 échantillons prélevés de 5 wilayas (Alger, Blida, Msila, Constantine et Oran) 28 échantillons (87.5%) étaient non conformes. Cette non-conformité représentant 87,5% est due soit à :

- _ Un taux élevé de germes viables totaux (levure et moisissure et GMT) pour 04 échantillons (14.28%)

_ La présence de germes spécifiés associés avec un taux élevé de microorganismes (levure, moisissure et GMT) pour 24 échantillons (85.72%). Ces résultats sont représentés sous forme d'un diagramme en secteurs (**Figure 11**):

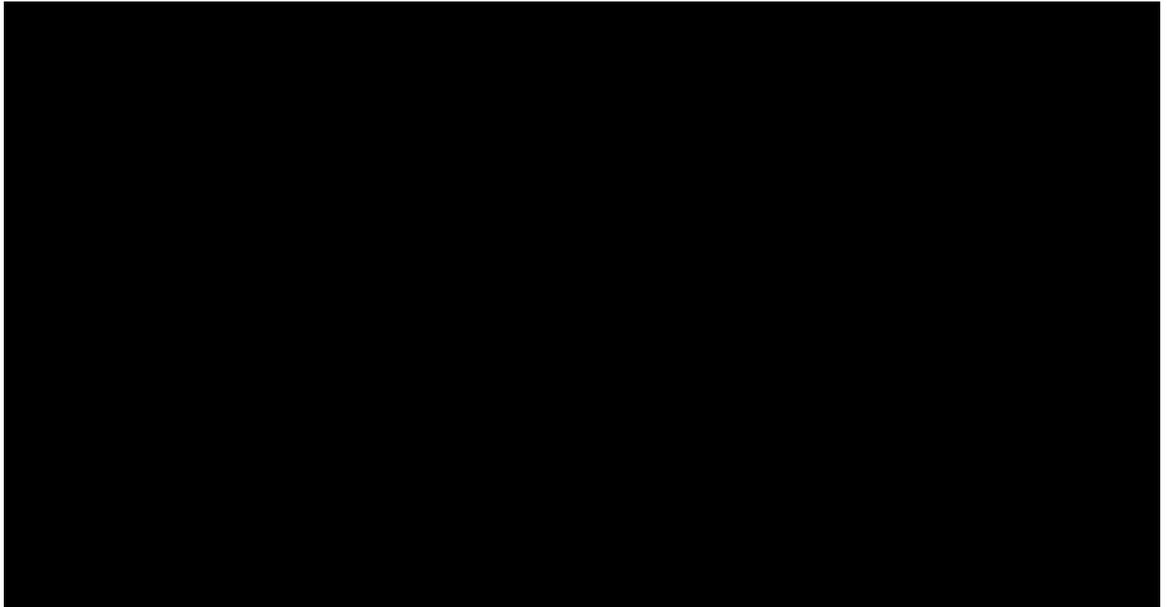


Ces résultats précédents sont regroupés en fonction de l'origine du prélèvement sous forme d'un tableau, **tableau VII** :

Tableau VII : Résultats groupés des prélèvements non-conformes d'éosine aqueuse.

Origine des prélèvements non conformes (28/32)	Présence de germes viables totaux supérieurs à la norme	Présence de germes spécifiés
Alger	0 (0%)	10 (100%)
Blida	0 (0%)	6 (100%)
Constantine	4 (66.7%)	2 (33.3%)
Oran	0 (0%)	4 (100%)
Msila	0 0%	2 100%

Ces résultats sont représentés sous forme d'un histogramme (**Figure 12**) :



On constate dans ces résultats de l'éosine aqueuse une prédominance de non-conformité par présence de germes spécifiés.

III. Résultats des lots non-conformes par présence de germes spécifiés :

Sur les 34 échantillons non-conformes 26 (76,5%) sont contaminés par les germes spécifiés (germes pathogènes «24 souches de *Pseudomonas aeruginosa* et 2 souches de *Pseudomonas fluorescens*» et un taux supérieur à 10 colonies/ml d'entérobactéries) ce qui nous pousse à conclure que les lots non-conformes par présence de germes spécifiés ont également un taux élevé d'entérobactéries et de germes viables totaux (bactéries+ levures et moisissures).

On remarque que tous les échantillons examinés ne contiennent pas de *staphylococcus aureus* ni des clostridies. Au cours de notre recherche les bactéries le plus souvent rencontrés sont des grams négatifs.

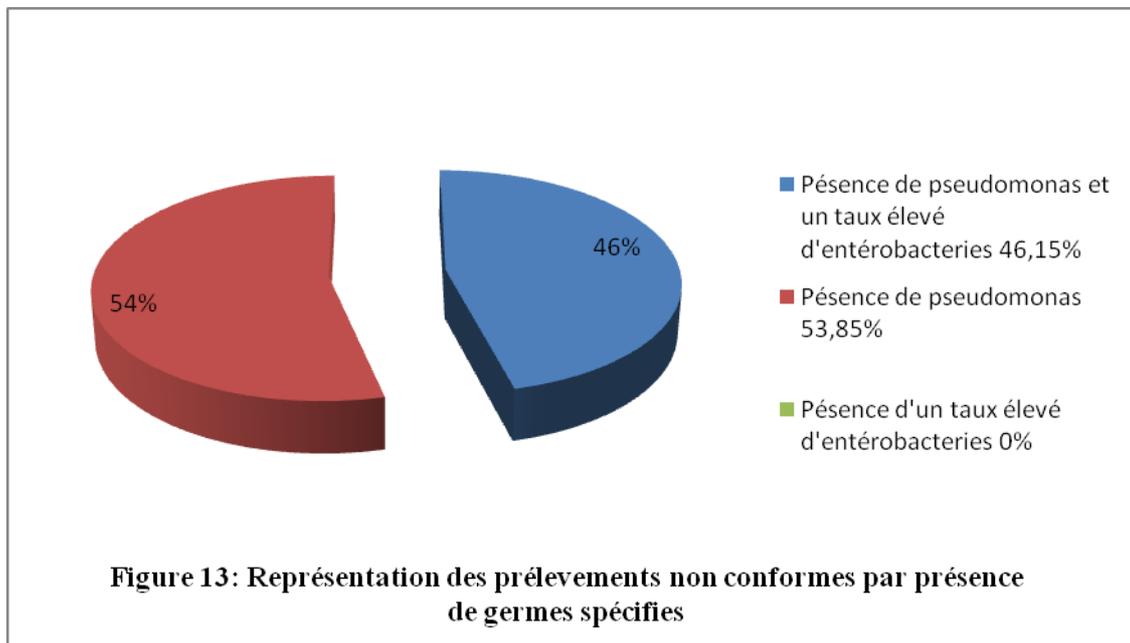
Ces résultats sont présentés dans le **tableau VIII** :

Tableau VIII : Résultats groupé des prélèvements non-conformes par présence de germes spécifiés.

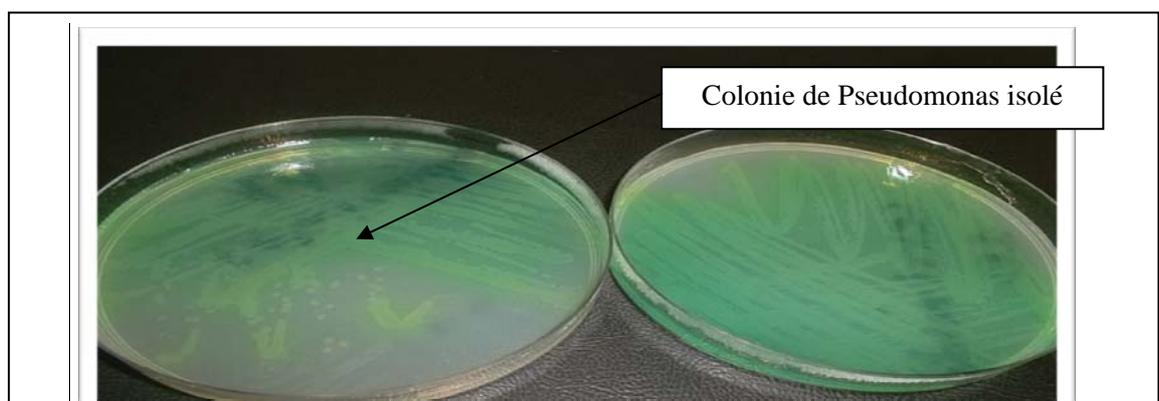
Origine	des	Germes spécifiés identifiés
---------	-----	-----------------------------

prélèvements non-conformes par la présence de germes spécifiques (26 /34)	Pseudomonas associés à un taux élevé d'entérobactéries	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ou <i>fluorescens</i>
Les 5 wilayas	12 (46,15%)	14 (53,85%)

les 26 /34 échantillons non conformes représentant : 53,85%(14 échantillons) sont contaminés par des pseudomonas « *Pseudomonas aeruginosa* ou *Pseudomonas fluorescens* » associés à un taux élevé d'entérobactéries, 46,15%(12 échantillons) sont contaminés que par des *pseudomonas* et l'absence d'entérobactéries ; au totale de 26 échantillons contaminer par des *Pseudomonas*, 24 ont été identifiées comme : *Pseudomonas aeruginosa* et 2 ont été identifiées comme : *Pseudomonas fluorescens* . Ces résultats sont représentés par la **figure 13 et 14** :



Nous constatons dans la **Figure 13** que presque la totalité des échantillons non conformes par présence de germes spécifiés est due à la présence de *Pseudomonas*



III.1. Interprétation des lots non conformes par présence de germes spécifiés par produits :

Sur les 26 lots qui étaient non conforme par la présence de germes spécifiés, l'éosine aqueuse représente 24 lots et le bleu de méthylène représente les 2 lots qui restent.

III.1.1. Bleu de méthylène :

Les 02 lots de bleu de méthylène non conformes par la présence de germes spécifiés ne sont contaminés que par des *Pseudomonas fluorescens* .

III.1.2. Eosine aqueuse :

Les 24 lots d'éosine aqueuse non conformes par la présence de germes spécifiés représentant : 12 échantillons (50%) sont contaminés par des *Pseudomonas aeruginosa* associés à un taux élevé d'entérobactéries et 12 échantillons (50%) ne sont contaminés que par des *Pseudomonas aeruginosa*.

IV. Résultats et Interprétation des lots non conformes par un taux élevé de microorganismes :

Pour les 08 lots non conformes par un taux élevé de microorganismes ils sont représentés par : 04 lots d'éosine aqueuse, 02 lots de bleu de méthylène et 02 lots de violet de gentiane, les calculs du dénombrement ont été effectués et les résultats sont représentés dans le **tableau IX** :

Tableau IX : Résultat des lots non conforme par un taux élevé de microorganisme.

Origine des prélèvements	Présence d'un taux élevé de microorganismes	GMT		Levures	
		Nombre de colonies	Norme 100colonies /ml	nombre de colonies	Norme 100colonies /ml

Alger	02 lots de bleu de méthylène	15x10 ² à 10 ²	>norme	/	<norme
	02 lots de violet de gentiane	70x10 ² à 10 ²	>norme	20x10 ²	>norme
Blida	0 lots	/	/	/	/
Constantine	4 lots d'éosine aqueuse	29x10 ³ à 3x10 ³	>norme	20 à 10	<norme
Oran	0 lots	/	/	/	/
Msila	0 lots	/	/	/	/

Les résultats de ce tableau ont montré que : seuls les échantillons d'éosine aqueuse prélevés dans la wilaya de Constantine sont non conformes par la présence d'un taux élevé de germes viables totaux, dont la valeur obtenue est de 29x10³, en ce qui concerne les levures et moisissures, le taux est inférieur à la norme. Les 04 échantillons non conformes par la présence d'un taux élevé de germes viables totaux prélevés dans la wilaya d'Alger, 02 lots de violet de gentiane ont présenté un taux élevé de GMT, dont la valeur la plus élevée obtenue est de 70x10² et un taux de levures et de moisissures de 20x10², les 02 lots de bleu de méthylène ont présentés un taux élevé de GMT, dont la valeur obtenue est de 15x10² (**Figures 15**).



Figure 15: Représentation des germes viables totaux ensemencés en profondeur dans un milieu TSA (photos personnelles).

Toutes les souches de *Pseudomonas* isolées et identifiées à l'aide d'une galerie API 20E lors de ces contrôles ont fait l'objet d'une recherche systématique de leurs sensibilités aux antibiotiques.

Les résultats sont regroupés dans le **tableau X** :

Tableau X: Résultats de l'antibiogramme des Pseudomonas.

Souche Antibiotiques :	Sièges	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 24/26 (92,3%)			<i>Pseudomonas fluorescens</i> 2 /26(7,7%)		
		sensible	intermédiaire	Résistant	sensible	Intermédiaire	résistant
Les βlactamines :							
Ticarcilline	TC	87,5%	0%	12,5%	100%	0%	0%
Ticarcilline+ acides clavulanic	TCC	62,5%	0%	37,5%	100%	0%	0%
Pipéracilline	PC	87,5%	0%	12,5%	100%	0%	0%
Ceftazidime	CAZ	12,5%	12,5%	75%	100%	0%	0%
Aztréonam	ATM	75%	12,5%	12,5%	100%	0%	0%
Cefotaxime	CTX	25%	62,5%	12,5%	100%	0%	0%
Imipenème	IMP	100%	0%	0%	100%	0%	0%

Les aminosides :							
Gentamicine	GN	75%	12,5%	12,5%	100%	0%	0%
Tobramycine	TOB	100%	0%	0%	100%	0%	0%
Amikacine	AK	75%	12,5%	12,5%	100%	0%	0%
Les polypeptides :							
Colistine sulfate	CS	100%	0%	0%	100%	0%	0%
Les quinolones :							
Ciprofloxacine	CP	100%	0%	0%	100%	0%	0%

On constate d'après les résultats d'antibiogramme que 12,5% des souches de *Pseudomonas aeruginosa* présentent un profil intermédiaire à l'Aztréoname, l'Amikacine et la Ceftazidime et 62,5% pour la cefotaxime ; ces derniers présentent un profil résistant de 12,5% pour la Ticarcilline ,Pipéracillin, l'Aztréoname, l'Amikacine, Cefotaxime et la Gentamicine ; 37,5% pour la ticarcilline+acide clavulanic et 75% Pour la ceftazidime .
(Voir Figure 16)

Les 24/26 souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont été isolées de l'éosine aqueuse et les 2/26 souches de *Pseudomonas fluorescens* ont été isolées de bleu de méthylène. (Voir Figure 17)



Figure 16: Représentation de l'antibiogramme d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* (photos personnelles).

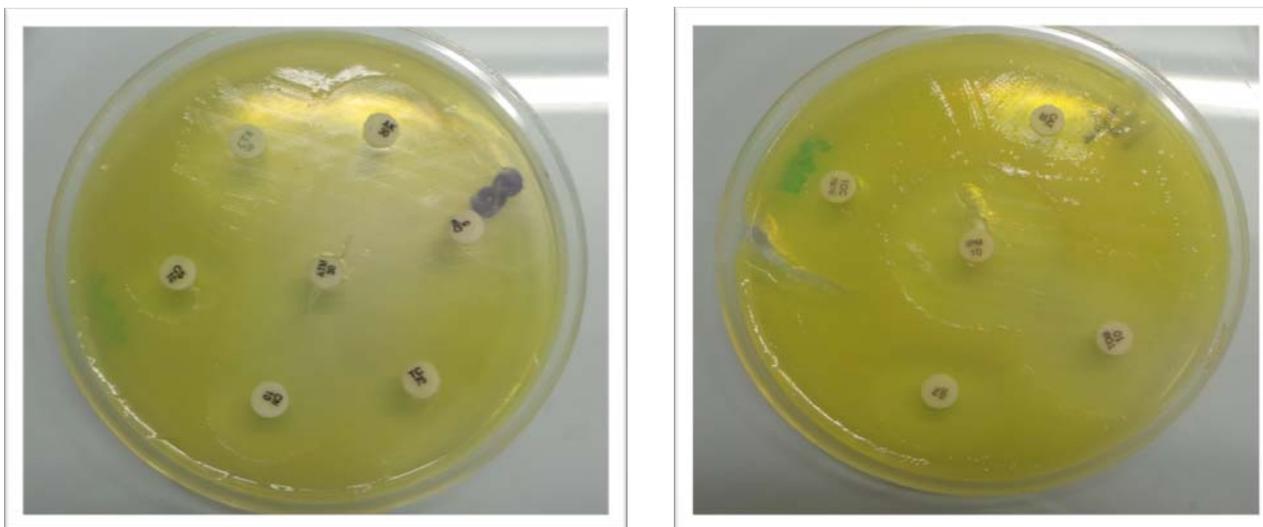


Figure 17: Représentation de l'antibiogramme d'une souche de *Pseudomonas fluorescens* (photos personnelles).

Discussion :

Suite à notre étude sur le contrôle microbiologique des 4 produits considérés à tort comme antiseptiques : l'éosine aqueuse, bleu de méthylène, violet de gentiane, l'eau oxygénée, commercialisés au niveau des officines de 5 wilayas (Alger, Blida, Constantine, Oran, Msila), première difficulté nous avons été confronté à la rareté de travaux traitant du même sujet.

Nous avons constaté que la non-conformité non seulement au contenu mais également au contenant.

En effet, le contrôle visuel des flacons et de leurs étiquetages montre que 70% d'étiquetage est erronée « mentionne que la solution est un antiseptique » et 24% des bouchons non sertis, ce qui permet de mettre en évidence la non-conformité de la majorité des échantillons contrôlés de l'ordre de 94%, provenant de 19 producteurs. Les flacons étaient non conformes par absence de sertissage ce qui peut expliquer la contamination des produits susnommés.

L'inscription erronée (produit antiseptique) sur les étiquettes rend non conforme le bleu de méthylène, l'éosine aqueuse et le violet de gentiane.

Sur les 100 lots ayant fait l'objet d'un contrôle microbiologique : l'ensemble des lots d'eau oxygénée étaient conformes et 34 lots (34%) étaient non conformes: 28 lots d'éosine aqueuse (82,35%), 4 lots de bleu de méthylène (11,76%) et 2 lots de violet de gentiane (5,89%) par contamination microbienne.

La non conformités des 4 échantillons de bleu de méthylène est due, d'une part à la présence des germes spécifiques (*Pseudomonas fluorescens*) représentant 50% alors le reste, (soit 50%) est du à un taux élevé de germes mésophile totaux.

La non-conformité des 02 échantillons de violet de gentiane est du a un taux élevé de microorganisme (levure et moisissure et GMT).

Sur les 28 échantillons d'éosine aqueuse non-conforme :

- 04 (soit 14.28%) présentent Un taux élevé de germes viables totaux (levure et moisissure et GMT) qui varie de 100 à 3000 par millilitre et le reste soit 24 échantillons (85.72%) sont contaminés par de germes spécifiés pathogènes associés à un taux élevé de microorganismes (levure et moisissure et GMT) dont 50% sont contaminés que par la présence *Pseudomonas aeruginosa* et 50% contaminer par *Pseudomonas aeruginosa* associes un taux élevé d'entérobactéries. en 2010 IRKI et BENALIOUECHE ont trouvé que 44/50 (soit 88%) des solutions d'éosine aqueuse sont non conformes dont 06 échantillons(13,63%) présentent un taux élevé de germes viables totaux (levure et moisissure et bactéries) ;tous les échantillons non conforme par présence d'un taux élevé des germes viable totaux ont présenté un taux élevé de bactéries, dont la valeur la plus élevée est de 4.10^5 d'UFC par millilitre. Pour ce qui est des levures et moisissure, leur taux le plus élevé est de 4.10^3 d'UFC par millilitre. Aussi est-il mentionné dans une etude précédemment faite par **RAHLAOUI et BENDALI** en 2000 la non-conformité des lots par un taux élevé des germes viables totaux de 30.10^4 bactéries par millilitre et absence des levures ou moisissures.

On note dans nos résultats l'absence des *staphylococcus aureus* et des *Clostridium perfringens* et on remarque la présence de germes a Gram(-), d'après **GAZENDEL et ORECCHIONI, (2001)** que les colorants ont une forte activité sur les gram positifs.

Parmi les échantillons trouvé non conformes par un taux élevé d'entérobactéries nous avons pu identifiés la présence des coliformes fécaux, d'après **RAOULT,(1998)**,la présence des coliformes fécaux est un indicateur de contamination fécale ce qui indique mauvaise hygiène dans la préparation de ces produits.

D'après nos résultats, on suspecte que la contamination de l'éosine aqueuse, bleu de méthylène et violet de gentiane pourrait survenir soit par:

- Un matériel contaminé et /ou des manipulateurs ne respectant pas les règles d'asepsie.
- Une mauvaise qualité microbiologique de la matière première.
- Une eau utilisée non stérile.
- Les bouchons non sertis et des flacons en PVC non stérilisés.

Il existe une similitude de nos résultats avec les travaux effectués au laboratoire nationale de santé en France par DRUILLES et *al*, 1985, en effet sur 24 solutions aqueuses d'éosine soumise à des contrôles microbiologique, 19 ont été trouvées abondamment contaminés par des bactéries avec prédominance de *Pseudomonas aeruginosa*. Par contre le taux de contamination en nombre de bactéries par millilitre varie de 380 à 1,5million bactéries par millilitre.

Ces résultats se rapprochent quantitativement par rapport aux résultats obtenus par notre étude, néanmoins ces produits dépassent la norme.

Il est évident que l'application répétée de plusieurs centaines de milliers de bactéries même s'il ne s'agit pas de pathogènes dit « opportunistes» sur une plaie ouverte, une brulure grave, ou une peau simplement irritée de nourrisson, peut se révéler très dangereuse.

les résultats d antibiogramme nous ont permis de mettre en évidence l'acquisition de nouvelles résistances par rapport aux données de la standardisation des antibiotiques 2011,il s'agit d'un pourcentage de 12,5% des souches de *Pseudomonas aeruginosa* présentent un profil résistant pour la Ticarcilline ,Pipéracillin, l'Aztréoname, l'Amikacine, Cefotaxime et la Gentamicine ; 37,5% pour la ticarcilline+acide clavulanic et 75% Pour la ceftazidime; alors qu'en année 2010 IRKI et BENALIOUACHE ont trouvé une résistance de 21,42% des souches de *Pseudomonas aeruginisa* qui présentent un profil résistant a la Ticarcilline et en 2000 RAHLAOUI et BENDALI ont trouvé une résistance de 5% pour la Gentamicine.

P.aeruginosa est habituellement moins sensible à la plupart des antibiotiques que les entérobactéries. Cette différence notamment vis-à-vis des β -lactamines, est due à l'expression naturelle de systèmes d'efflux (mécanisme non enzymatique) en association avec une plus faible affinité.(LECLERQ et *al.*, 2012)

Cette résistance pose un problème dans la thérapie, étant donné que ces infections cutanées contaminée par les *Pseudomonas* vont non seulement surinfecter une plaie par

une suppuration verdâtre due au pigment pyocyanique, mais également à la résistance rebelle au traitement de ces infections par les antibiotiques utilisées en dermatologie.

Conclusion

Conclusion :

Suite aux résultats obtenus sur le contrôle microbiologique des quatre produits considéré a tort comme étant des antiseptiques qui sont : l'éosine aqueuse, le bleu de méthylène, le violet de gentiane, l'eau oxygénée fabriqués en Algérie par des industriels et vendue dans les pharmacies, nous avons constaté un pourcentage de non-conformité microbiologique de l'ordre de 34% dont la partie la plus élevée est représenté par l'éosine aqueuse de l'ordre de 82,35% ; cette contamination élevée de l'éosine aqueuse pose un sérieux problème de santé publique vu l'utilisation fréquente de ce produit pharmaceutique en Algérie. .

Cette étude nous a révélé une non-conformité aussi bien du contenant que du contenu. Les étiquettes étaient non conformes par l'inscription «antiseptique» alors que les produits mis en examen n'ont aucune activité antimicrobienne ou une très faible activité, les

bouchons n'avaient aucune protection et n'étaient pas sertis, par conséquent peuvent être facilement contaminés.

Ceci nous mène à conclure à une non-conformité totale des échantillons « l'étiquette et de contenant ».

Dans les conditions de fabrication actuelle il serait préférable d'arrêter la production de l'éosine aqueuse, bleu de méthylène et violet de gentiane la reprise de cette production ne peut être envisagée que lors d'une fabrication sous forme de capsule monodose à usage unique et stérile.

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

AFNOR, 1981. Antiseptiques et désinfectant. NF T., 72-101 pp.

AFNOR., 1992. Guide pour la décontamination : le nettoyage et la stérilisation des instruments de chirurgie. 2eme Ed. Afnor, Paris.

BACHA D., 1984. La désinfection. Collection le cours de médecine. 01-10 pp.

BENDALI M. et REHALAOUI A, mémoire de fin d'études intitulé « contrôle de qualité microbiologique de l'éosine aqueuse ».

BILLAST N., DUFFET A. et DUMARTIN C., 2000. Antiseptiques et désinfectants. C.CLIN-PARIS-NORD-MAI., 05-65 pp.

BOURGEOIS C.M MEXLE J-F, ZUCCA J., 1990. Microbiologie alimentaire aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité. Ed. Tec & Doc, Paris, pp : 51, 65.

CHU DE PITIE, 2003 Bacteriologie DCEMI 2002-2003 Service de Bactériologie Mise à jour : 24 mars 2003 p84/122PP

CROUZILLES C., 2009. Infectiologie et hygiène - Gestion des risques et soins infirmes. Ed. Elsevier Masson, 173 pages.

CCLIN, 2000 (centre de la lutte contre les infections nosocomiales de l'inter région Paris-Nord). Antiseptiques et désinfectants Paris-Nord mai 2000.35 pp

DELARRAS C., 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Ed. Tec & Doc, 476 pages.

DELARRAS et TREBAOL, 2003.surveillance sanitaire et microbiologique des eaux. Ed. Tec & Doc/ EM inter Paris.

DORVAULT, 1995. L'officine. 23^e éd, Vigot, Paris, 2089 pages.

DRUILLES J., CHANTEFORT A., NETTER R.

Solution aqueuses d'éosine.

Contamination microbienne.

Le moniteur des pharmacies et des laboratoires –MPL-1674/-1985.

FAUCHERE J.L. et AVRIL J.L., 2002. Bactériologie médicale. Ed. Ellipses, Paris, 356 Pages.

FIGUIER L., 2009. L'année scientifique et industrielle. Vingt-troisième année, 572 pages.

FLEURETTE J., 1998., Antiseptiques et antiseptie. 666 pages.

FLEURETTE J., FRENEY J. et REVERDY M.E., 1995. Antiseptie et désinfection. Ed. ESKA, Paris.

GAZENDEL J.M., 2007. Le préparateur en pharmacie. Ed. Tec & Doc. 282 pages.

GAZENDEL J.M. et ORECCHIONI A.M., 2001.le préparateur en pharmacie. Ed. Tec & Doc. 115 pages.

HIR A., 2001. Pharmacie galénique : Bonnes pratiques de fabrication des médicaments. Ed. Masson, 402 pages.

HUGO W.B. et RUSSELL A.D., 1992. Pharmaceutical microbiology. Blackwell Scientific Publications, 524 pages.

JOFFIN J.N. et LEYRAL G. 2001. Microbiologie technique : Dictionnaire des techniques, Tome 2, Documents Techniques, 2ème Ed. 299 pages.

LIGHTFOOT N.F et MAIER E.A., 2002. Analyses microbiologique des aliments et de l'eau. Guide pour l'assurance qualité édition scientifique OB. Institut de Lille.

LORETTE, G. et LACOUR J. P., 2007. Dermatologie pédiatrique. 1st Ed. Wolters Kluwer, 205 pages.

LECOMPTE M., 2013. (Cercle Mycologique de Namur & Cercle des M.L.B.) Fiche technique

MARCHAL N., BOURDEAU J.C., RICHARD C, 1982. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed.Doin, Paris 482 pages.

MARCK V., 2010. Manuel de techniques d'anatomo-cytopathologie: Théorie et pratique. Ed. Elsevier Masson, 183 pages.

Martin C., 2008. Urgences et infections: Guide du bon usage des antibiotiques, antifongiques, antiviraux et antiseptiques. Ed. Arnette, France, 247 pages.

MAUTRAIT C. et RAOULT R.,1994. Guide pratique des dermatoses et soins courants à l'officine. Ed. Masson, Paris, 221 pages.

MCDONNELL G. et RUSSELL A.D., 1999. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance, Clinical Microbiology Reviews, 147-179 pp.

Michard-MARCHAL C., Michard C. et Ribery C., 1982. Sexisme et sciences humaines. Presses universitaires, Ille, 200 pages.

PARADEAU, 1992. analyse pratique de médicament. Ed. E. Minter, Paris.1097pages.

PHARMACOPÉE EUROPÉENNE, 1997. Techniques de contrôle microbiologique des produits pharmaceutiques. 3^{ème} édition décembre 1997. 83-84, 298 pp.

PILET C., BOURDON J., TOMAB L., MARCHAL N.et SALBFTERE C., 1979. Bactériologie médicale et vétérinaire. Ed. Dion, Paris, 437 pages.

PLACET-THOMAZEAU et al., 2000-2001 le bon usage des antiseptiques groupe de travail C.CLIN sud-ouest France 2000/2001, 48 pages.

SCRIBAN, 1999. Biotechnologie. Paris .927pp.

VAUBOURDOLLE M., 2007. Biochimie Hématologie. 3eme Ed. 1116 pages.

VIDAL B., 1995. Dictionnaire. Communication, traduction et transparence : de l'altérité du traducteur. Ed. Presses université, Montréal, 40 : 372-378 pp.

WOLKENSTEIN P, VAILLANT L.

Les antiseptiques en peau lésée. Ann Dermatol Vénérolog, 1996, 123 : 343-348.

STALDER JF, FLEURY M, SOURISSE M et al., 1994

Local steroid therapy and bacterial skin flora in atopic dermatitis. Br J Dermatol, , 131 : 536-540.

VAILLANT L. & MARTIN L., 2005. Thérapeutique en dermatologie

Annexes

Annexes :

1-1 Annexe I matériels :

Au laboratoire nous avons utilisé le matériel suivant :

a) appareillages:

- autoclave pour la stérilisation
- poste sécurité microbiologique (PSM)
- étuve (incubateurs de 25°C, 37°C, 44°C)
- bec bunsen
- agitateur magnétique
- compteur de colonies

b) verrerie et petit matériel

- tubes à essai
- pipette graduée de 10 ml et 1 ml stériles
- pipette pasteur
- flacon de verre
- boite de pétri
- Lame et lamelle
- papier filtre

c) milieu de culture et réactifs:

- milieu gélosé Sabouraud glucosé
- milieu gélosé TSA liquéfié
- milieu Chapman
- milieu Cetrimide
- milieu gélose lactosé bilié au cristal violet et au rouge neutre
- bouillon nutritif
- bouillon lactosé bilié au vert brillant
- bouillon lactosé bilié au pourpre de bromocrésol
- solution eau péptonée au chlorure de sodium
- lugol
- alcool
- violet de gentiane
- la fuchsine
- l'eau physiologie ou l'eau distillée
- disque d'oxydase
- l'huile de paraffine
- Kovacs
- indole
- NIT1 et NIT2
- la poudre de zinc

Les milieux de cultures :

1-Milieu eau peptonée tomponée(EPT) :
Milieu d'enrichissement non sélectif des bactéries.

Formule en g/l d'eau distillée :

Peptone de viande.....	10
Chlorure de sodium.....	05
Tompon phosphate.....	10

Ph=7.2±0.2

2 Milieux TSA :

Milieu de culture et l'isolement de microorganisme exigeant et permet la detection de la réaction hémolytique

Formule en g/l d'eau distillée :

Peptone de caséine.....17g

Peptone de soja.....03g

Chlorure de sodium.....05g

Glucose.....2.5g

Agar.....18g

Ph=7.3±0.1

3 Milieu de culture sabouraud+chloramphenicol :

Milieu utilisé pour l'isolement et l'identification des levures et des moisissures saprophytes ou pathogènes

Formule en g/l d'eau distillée :

Neopeptone.....10g

Glucose.....20g

Chloramphénicol.....0.5g

Agar.....20g

Ph=6.5

4 Milieu VRBL:

Milieu utilise pour le dénombrement des entérobactéries dans les produits laitiers et autre denrées alimentaires.

Formule en g/l d'eau distillée :

Peptone de viande07g

Extrait de levure.....03g

Lactose.....10g

Sels biliaires.....02g

Chlorure de sodium.....05g

Cristal violet.....0.002g

Rouge neutre.....0.03

Agar.....18g

Ph=7.4

5 Gélose Chapman :

Milieu sélectif permettant l'isolement et l'enrichissement des staphylocoques pathogènes.

Formule en g/l d'eau distillée :

Tryptone.....05g

Extrait de levure.....03g

Extrait de viande03g
Chlorure de sodium.....70g
Peptone bacteriologique.....10g
Mannitol.....10g
Rouge phénol.....0.05g
Agar.....18g
Ph=7.4±0.1

6 Gélose cetrimide :

Milieu de culture utilisé pour la culture croissance des *Pseudomonas aeruginosa*.

Formule en g/l d'eau distillée :

Digeste pancréatique de gélatine.....20g
Sulfate dipotasique.....10g
Chlorure de magnésium.....1.4g
Cetrimide.....0.3g
Agar.....13.6
Ph=7.2±0.2

7- Milieu TSI :

Milieu utilisé pour l'identification des entérobactéries. Il permet de voir si la [bactérie](#) est capable de réduire le sulfate.

Formule en g/l d'eau distillée :

Peptones de caséine..... 15
Peptones de viande..... 5
Extraits de viande3
Peptones de levure3
Na cl..... 5
Lactose10
Saccharose10
Glucose..... 1
Citrate ammoniacal de 0,5
Thiosulfate de sodium..... 0,5
Rouge de phénol0,024
Agar12

8- Milieu viande foie :

Milieu de culture et d'isolement de clostridium perfringens

Formule en g/l d'eau distillée :

Peptone viande foie.....30
Glucose.....2
Agar.....6
ph.....7,3±0,2

Annexe II

Tableau VIII: Extrait de tableau de la lecture de la galerie API 20E

tests	composants actifs réactions/enzymes	résultats	
		négatif	positif
ONPG	2-nitrophényl-B-D-galactopyranoside (B-galatosidase)	Incolore	jaune et jaune légère
ADH	L-arginine (arginine dihydrolase)	jaune	rouge orange
LDC	L-lysine (lysine décarboxylase)		
ODC	L-orthinine (orthinine décarboxylase)		
CIT	Trisodium citrate (utilisation)	vert pale/jaune	bleu vert/bleu dans la cupule
H ₂ S	Sodium thiosulfate (production H ₂ S)	incolore/grisâtre	dépôt noir/fin liseré
URE	Urée (urease)	jaune	rouge/orangé

TDA	L-tryptophane (tryptophane désaminase)	jaune	marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane (production d'indole)	incolore vert pale/jaune	rose
VP	Sodiumpyruvate (production d'acétoine)	incolore	rose/rouge (après 10min noter négatif)
GEL	Gélatine d'origine bovine (gélatinase)	pas de diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	bleu/bleu vert	jaune
MAN	D-manitol		
NO	Inositol		
SOR	D-sorbitol		
RHA	L-rhamnose		
SAC	D-saccharose		
MEL	D-melibiose		
AMY	Amygdaline		
ARA	L-arabinose		
OX	test oxydase hors galerie		



Disque d'oxydase

Tableau VIII: Tableau d'identification de l'espèce *Pseudomonas aeruginosae* avec la galerie

API 20E

tests	composants actifs réactions/enzymes	resultat
ONPG	2-nitrophényl-B-D-galactopyranoside (B-galatosidase)	-
ADH	L-arginine (arginine dihydrolase)	+
LDC	L-lysine (lysine décarboxylase)	-
ODC	L-orthinine (orthinine décarboxylase)	-
CIT	Trisodum citrate (utilisation)	+
H ₂ S	Sodium thiosulfate (production H ₂ S)	-
URE	Urée (urease)	-

TDA	L-tryptophane (tryptophane désaminase)	-
IND	L-tryptophane (production d'indole)	-
VP	Sodiumpyruvate (production d'acétoine)	-
GEL	Gélatine d'origine bovine (gélatinase)	+
GLU	D-glucose	+
MAN	D-manitol	-
NO	Inositol	-
SOR	D-sorbitol	-
RHA	L-rhamnose	-
SAC	D-saccharose	-
MEL	D-melibiose	-
AMY	Amygdaline	-
ARA	L-arabinose	-
OX	test oxydase hors galerie	

- : une réaction négative

+ : une réaction positive

ANNEXE III

Tableau X: valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Pseudomonas aeruginosa*.

Condition du test :

-**Milieu:** Gélose Mueller-Hinton.

-**Inoculum :** Colonies en suspension, 0,5 Mc Farland.

-**Incubation :** 35°C, atmosphère ordinaire; 18h.

-**contrôle de qualité :** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)	
		Résistant	Intermédiaire	Sensible	Résistant	Sensible
Les β lactamines : Ticarcilline Pipéracilline						

Ceftazidime			—		≥128	≤ 64
Aztréonam	75 µg	≤ 14	—	≥15	≥128	≤64
imipeneme	100 µg	≤ 17	15-17	≥18	≥ 32	≤ 8
	30 µg	≤ 14	16-21	≥ 18	≥ 32	≤ 8
	10 µg	≤ 15	14-15	≥ 22	≥ 16	≤ 8
	10 µg	≤ 13		≥ 16		≤ 4
Les aminosides :						
Amikacine	30 µg	≤ 14	15-16	≥ 17	≥ 32	≤ 16
Gentamicine	10 µg	≤ 15	13-14	≥ 15	≥ 8	≤ 4
Tobramycine	10 µg	≤ 13	13-14	≥ 15	≥ 8	≤ 4
Les quinolones :						
Ciprofloxacine	5 µg	≤ 15	16-20	≥ 21	≥ 4	≤ 1